

N^O d'enregistrement
au C.N.R.S.
N^O A O 4329

ARTICLE PRINCIPAL

recouvrant en partie

LA THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

par

Hélène TEMKINE, née BUC

Sujet de la Thèse : Le métabolisme glycolytique du globule rouge humain
 Etude des diphosphodérivés et des mécanismes de régulation.

Soutenue le 20 Mai 1970 devant la Commission d'Examen

Mr. A. THOMAS Président

Mr. A. HOLLANDE
Mr. P. CARTIER Examineurs



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549002_0042

N^o d'enregistrement
au C.N.R.S.
N^o A O 4329

ARTICLE PRINCIPAL

recouvrant en partie

LA THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

par

Hélène TEMKINE, née BUC

Sujet de la Thèse : Le métabolisme glycolytique du globule rouge humain
Etude des diphosphodérivés et des mécanismes de régulation.

Soutenue le 20 Mai 1970 devant la Commission d'Examen

Mr. A. THOMAS Président

Mr. A. HOLLANDE
Mr. P. CARTIER Examineurs



LES ENZYMES DU GLOBULE ROUGE HUMAIN. SÉPARATION ET CARACTÉRISTIQUES.

par Hélène TEMKINE.

*Laboratoire de Biochimie Médicale, Professeur P. CARTIER,
Hôpital des Enfants Malades, 149, rue de Sèvres, Paris (15°).*

(Mémoire reçu le 3 février 1966).

Résumé. — Par séparation sur colonne de TEAE cellulose en gradient salin, les enzymes glycolytiques du globule rouge humain ont été partiellement purifiés.

Par une première adsorption sur TEAE cellulose, l'hémoglobine non adsorbable à pH 7,0 est éliminée de l'hémolysat. Les enzymes, rechromatographiés sur une colonne de TEAE cellulose, émergent dans l'ordre suivant : aldolase, triosephosphate deshydrogénase, triosephosphate isomérase, 6-phosphogluconate deshydrogénase, phosphoglycérate mutase, hexokinase, lactico deshydrogénase, enolase, pyruvate kinase, glucose-6-phosphate deshydrogénase, et phosphofructokinase.

La fraction non adsorbée à pH 7,0 a été rechromatographiée sur TEAE cellulose tamponnée à pH 8,5 qui sépare la phosphohexose isomérase et la phosphoglycérate kinase.

L'activité spécifique des fractions traduit une purification importante, qui, pour dix des treize enzymes est comprise entre 60 et 370 fois l'activité spécifique de l'hémolysat. Sur chaque enzyme ainsi enrichi, la courbe de pH optimum et les constantes de Michaelis vis-à-vis des substrats et des coenzymes ont été déterminés.

Les deux phosphatases caractéristiques du système de néoglycogénèse (glucose-6-phosphatase et fructose diphosphate-phosphatase) n'ont pu être décelées ni dans l'hémolysat, ni dans les fractions d'élution.

L'étude des caractéristiques cinétiques des divers enzymes de la glycolyse du globule rouge nécessite une purification préalable, d'une part, pour se débarrasser de l'hémoglobine (330 mg/ml), d'autre part, pour concentrer les diverses activités et éliminer les enzymes pouvant interférer dans la mesure des constantes cinétiques.

Diverses méthodes ont été proposées pour éliminer l'hémoglobine. Celle proposée par HUENNEKENS et coll. [1] qui l'entraîne à basse température par un mélange éthanol-chloroforme n'est applicable qu'à l'isolement d'enzymes peu sensibles à la dénaturation.

HENNESSEY et coll. ont réalisé une séparation en adsorbant l'ensemble des enzymes glycolytiques à pH 7 sur la DEAE cellulose, l'hémoglobine restant dans la fraction surnageante.

Le principe de cette méthode a été appliqué à la purification des divers enzymes du globule rouge humain, en réalisant une séparation sur colonne de cellulose modifiée.

Nous avons comparé deux celluloses : la DEAE et la TEAE : un meilleur pouvoir résolutif a été obtenu avec la seconde, qui nous a permis d'amener treize enzymes à un degré de purification compatible avec la mesure de leurs caractéristiques cinétiques.

TECHNIQUES.

Le sang humain a été prélevé par ponction veineuse sur héparine. Les globules rouges sont séparés du plasma et de la couche surnageante de leucocytes par centrifugation à 0° pendant 15 minutes à 1500 g. Le culot globulaire est lavé deux fois avec une solution refroidie de KCl 0,154 M. Ce culot est hémolysé par congélation à -25° et décongélation lente.

1) Préparation de la colonne chromatographique.

La TEAE cellulose (Serva, capacité : 0,71 mEq/g) est agitée pendant deux heures en présence d'une solution de PO_4HK_2 1 M (pH = 9,1), lavée à l'eau distillée jusqu'à neutralité du surnageant, puis équilibrée pendant une nuit avec le tampon servant à préparer la colonne. Toutes les opérations ultérieures sont réalisées à + 2°. L'hémolysat est agité avec la suspension de TEAE cellulose pendant 30 minutes. Les conditions optima de concentration correspondent à 1 volume d'hémolysat au 1/2 (généralement 20 ml) pour 1 volume d'une suspension de 8 g de TEAE cellulose dans 100 ml du tampon de colonne. Deux tampons ont été retenus :

tampon 1 — $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}/\text{PO}_4\text{HNa}_2$ 3.10^{-3} M, pH 7,0.

tampon 2 — Tris 3.10^{-3} M, pH 7,0.

L'hémoglobine non adsorbée est séparée par centrifugation et le culot de cellulose est remis en suspension dans le tampon de préparation de la colonne, puis centrifugé. Ce lavage est répété jusqu'à l'obtention d'un surnageant pratiquement incolore. Le culot est finalement remis en suspension dans le volume minimum de tampon.

La colonne de 20 mm de diamètre et de 250 mm de haut, garnie d'une plaque de verre fritté de porosité 1, est remplie aux 2/3 avec le tampon. La TEAE cellulose est versée par petites fractions et sédimentée par écoulement du tampon sur une hauteur de 150 mm environ.

Abréviations employées dans le texte.

DEAE : Diethylaminoéthyl cellulose. — TEAE Triéthylaminoéthyl cellulose. — TRIS : Trihydroxyméthyl-aminomethane. — TEA : Triéthanolamine. — F-6-P : Fructose-6-phosphate. — FDP : Fructose-1,6-diphosphate. — GAP : Phosphoglyceraldéhyde. — G-6-P : Glucose-6-phosphate. — PEP : Phosphoenolpyruvate. — 2-PG : 2-Phosphoglycérate. — 3-PG : 3-Phosphoglycérate. — 6-PG : 6-Phosphogluconate. — Pyr : Pyruvate.

Une légère pression, inférieure à 25 mm de mercure est appliquée pour compléter le tassement de la TEAE cellulose.

Après écoulement du tampon, la suspension de TEAE cellulose ayant adsorbé les enzymes est déposée lentement à la surface supérieure de la colonne, la couche homogène ainsi réalisée représentant environ le 1/10 de la hauteur totale de TEAE cellulose.

L'élution est effectuée par une solution de NaCl, dont on fait varier la concentration entre 0 et 0,5 M selon un gradient de profil concave [3]. Ce gradient est obtenu avec deux récipients cylindriques de diamètres différents en communication par leur partie inférieure (réservoir : diamètre 20 mm, 100 ml NaCl 0,5 M dans le tampon de départ, mélangeur : diamètre 35 mm, 300 ml de tampon PO_4 ou Tris 0,003 M, pH = 7,0).

Le mélangeur alimente la colonne par l'intermédiaire d'une pompe à débit constant (micro DCL) réglée sur un débit de 60 ml/heure. Des fractions de 10 ml sont recueillies à l'aide d'un collecteur de fractions.

A la sortie de la colonne, l'éluat passe au travers d'une micro cellule de conductivité (Prolabo n° 6.679), reliée à un conductimètre : ce montage permet de suivre les variations de concentration en NaCl et de contrôler la forme du gradient de concentration.

2) Méthode de dosage.

Certains enzymes (en particulier la triosephosphate deshydrogénase et la phosphofructokinase) sont très sensibles à la dénaturation en solution diluée. Les activités enzymatiques sont déterminées aussi rapidement que possible après la séparation et les enzymes sont protégés par addition à l'éluat de mercaptoéthanol [4].

Dans chaque fraction, on prélève 1 à 2 ml pour déterminer la concentration en protéine (selon LOWRY) [5], exprimée en μg de sérum-albumine et en hémoglobine (absorption à 413 $\text{m}\mu$). On ajoute aussitôt à l'éluat restant 20 μl de mercaptoéthanol.

Les dosages enzymatiques sont effectués en mesurant les variations spectrales des pyridines nucléotides (NAD, NADP, NADH_2 , NADPH_2) fonctionnant soit directement comme coenzyme d'un enzyme étudié, soit indirectement comme coenzyme d'une réaction couplée. Les variations de densité optique sont mesurées soit au spectrophotomètre automatique Jouan à 340 $\text{m}\mu$ ($\epsilon_{340} \text{ m}\mu = 6,22 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mole}$), soit au photomètre automatique Eppendorf à 366 $\text{m}\mu$ ($\epsilon_{366} \text{ m}\mu = 3,30 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mole}$).

Deux tampons sont utilisés :

— Tris, à concentration finale de 0,05 M, pH = 8,1.

— Triethanolamine, 0,05 M/EDTA 0,005 M (concentrations finales) pH = 7,5.

Les enzymes introduits dans les dosages sont des préparations purifiées (Boehringer), ainsi que les substrats suivants : F-6-P, FDP,

TABLEAU I.
Méthodes de dosage des activités enzymatiques.

Enzymes	Tampon	Substrats	Pyridine nucléotides	Autres réactifs	Référence
Hexokinase.....	TRIS pH 8,1	Glucose 3 mM	NADP 0,4 mM	ATP 3mM, MgCl ₂ 10mM, G-6-PH: 1,4 UI	(9)
Phosphohexose isomérase.	TRIS pH 8,1	F-6-P 3 mM	NADP 0,4 mM	MgCl ₂ 10mM, G-6-PD: 1,4 UI	(10)
Phosphofructo kinase.....	TRIS pH 8,1	F-6-P 3 mM	NADH ₂ 0,3 mM	ATP 3mM, MgCl ₂ 10 mM, Glycero PD: 7 UI, TPI: 15 UI, A: 1 UI	(9)
Aldolase.....	TRIS pH 8,1	FDP 3 mM	NADH ₂ 0,3 mM	Glycero PD: 7 UI, TPI: 15 UI	(11)
Triose phosphate deshydrogénase.....	TEA/EDTA pH 7,5	Ga ₃ P 1,4 mM	NAD 0,4 mM	Arséniate 12mM	(12)
Triose phosphate isomérase	TRIS pH 8,1	Ga ₃ P 1,4 mM	NADH ₂ 0,3 mM	Glycero PD: 7 UI	(13)
Phosphoglycérate kinase..	TRIS pH 8,1	3-PG 3 mM	NADH ₂ 0,3 mM	ATP 3 mM, MgCl ₂ 10mM, TPD: 4 UI, mercaptoethanol 5 µl	(14)
Phosphoglycérate mutase..	TEA/EDTA pH 7,5	3-PG 3 mM	NADH ₂ 0,3 mM	ADP 3mM, MgCl ₂ 10mM, LD: 18 UI, PK: 9 UI, E 3 UI	(15)
Enolase.....	TEA/EDTA pH 7,5	2-PG 3 mM	NADH ₂ 0,3 mM	ADP 3mM, MgCl ₂ 10mM, LD: 18 UI, PK: 9 UI	(15)
Pyruvate kinase.....	TEA/EDTA pH 7,5	PEP 3 mM	NADH ₂ 0,3 mM	ADP 3mM, MgCl ₂ 10mM, LD: 18 UI	(16)
Lactico deshydrogénase...	TRIS pH 8,1	Pyr 1 mM	NADH ₂ 0,3 mM		(17)
Glucose-6-phosphate deshydrogénase.....	TRIS pH 8,1	G-6-P 3 mM	NADP 0,4 mM	MgCl ₂ 1 omM	(18)
6-phosphogluconate deshydrogénase.....	TRIS pH 8,1	6-PG 3 mM	NADP 0,4 mM	MgCl ₂ 10mM	(19)
Diphosphoglycérate mutase.....	PO ₄ 0,1M pH 7,5	Ga ₃ P 1,4 mM	NAD 0,4 mM	3-PG 0,07mM, TPD .4 UI	(20)
Methemoglobin réductase	PO ₄ 0,1M pH 7,0	NADPH ₂ 0,05 mM		Bleu de Méthylène 0,01 p. 100: 10 µg	(21)

G-6-P, 3-PG, 2-PG (Boehringer), glucose-1-phosphate, (NBC), ATP, ADP, NAD, NADP, NADH₂ et NADPH₂ (Pabst). Le phosphoglyceraldéhyde a été préparé selon la méthode d'OESPER [6] et le phosphoenolpyruvate selon OHLMEYER [7].

Les techniques enzymatiques sont résumées dans le tableau I. Les techniques originales indiquées dans le tableau ont été légèrement modifiées [8] dans le but de standardiser les réactifs utilisés. Après équilibration pendant 2 minutes des cuves contenant l'ensemble des réactifs, le dosage est déclenché par l'addition du substrat.

Par ailleurs,

— la nucléoside phosphorylase a été dosée par spectrophotométrie à 293 m μ en tampon PO₄, 0,03 M, pH = 7,5, en présence d'inosine mM et de xanthine oxydase Boehringer : 0,4 mg (soit 0,016 UI) [22].

— la catalase par spectrophotométrie à 240 m μ , en tampon PO₄, 0,03 M, pH = 7,0, en présence de H₂O₂, 0,15 volumes [23].

— phosphatases acides : incubation à 37° pendant 30' en tampon citrate 0,2 M, pH = 5,6, en présence de paranitrophényl phosphate et dosage colorimétrique [24].

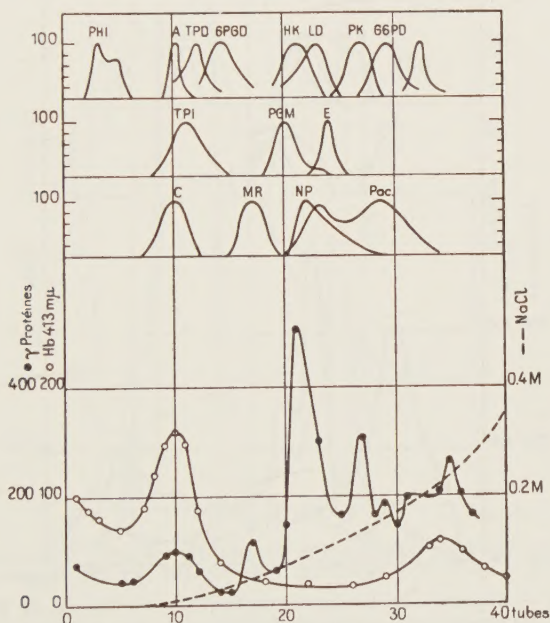


FIG. 1. — Séparation chromatographique sur colonne de TEAE.
Elution par gradient de PO₄/NaCl à pH = 7,0.

(Les activités enzymatiques sont exprimées en pourcentage de l'activité maximum).

RÉSULTATS.

La grande reproductibilité des différentes séparations chromatographiques effectuées nous a permis de rassembler, dans les figures 1 et 2, l'ensemble de nos résultats.

La figure 1 représente l'élution en gradient NaCl, d'une colonne de TEAE cellulose, équilibrée à pH = 7,0, en tampon phosphate. L'hémoglobine résiduelle est éluée très rapidement dès que l'on fait passer la solution de NaCl sur la colonne. On retrouve également dans cette fraction une activité catalasique. En fin d'élution, pour une concentration saline d'environ 0,21 M, apparaît une fraction faiblement colorée, que nous n'avons pas identifiée.

Sept fractions protéiques apparaissent aux concentrations en NaCl : 0,01 M - 0,04 M - 0,08 M - 0,13 M - 0,15 M - 0,18 M - 0,24 M.

Le pic le plus important (0,08 M) coïncide avec la nucléoside phosphorylase, d'activité très élevée.

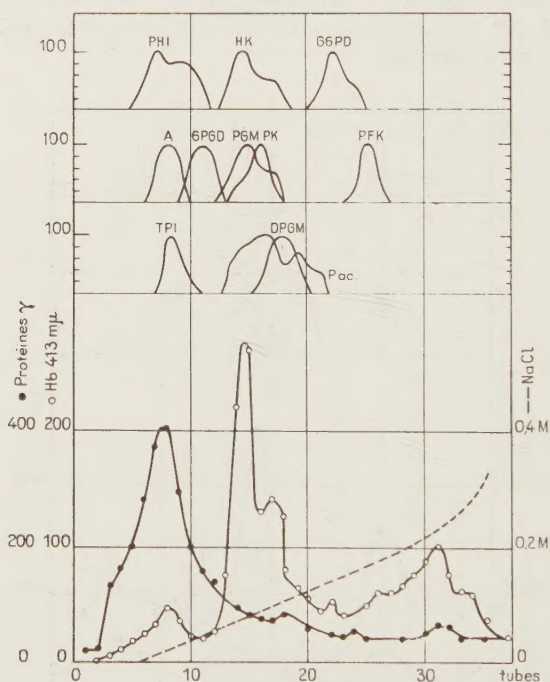


FIG. 2. — Séparation chromatographique sur colonne de TEAE.
Elution par gradient Tris/NaCl à pH = 7,0.

Dans la figure 2, le tampon Tris pH 7,0 a été substitué au tampon phosphate et l'élution réalisée avec le même gradient salin. L'hémo-

globine résiduelle présente les mêmes caractères d'éluion, mais la séparation des fractions protéiques est moins satisfaisante, comme le montre la courbe des dosages de protéines. L'ordre d'éluion des divers enzymes est le même que dans le système tampon PO_4 , mais les pics sont moins symétriques et nettement plus étalés.

Nous avons adopté le tampon phosphate pour séparer et analyser les propriétés de la plupart des enzymes de la glycolyse. Toutefois, pour certains d'entre eux, dont la mesure de l'activité est gênée par la présence d'ion PO_4 (telles la triosephosphate deshydrogénase, la phosphofructokinase, la 2,3 diphosphoglycérate mutase et les phosphatases acides) nous avons utilisé le système tampon Tris pour isoler ces enzymes.

Certains enzymes ne sont pratiquement pas adsorbés par la TEAE cellulose à $\text{pH} = 7,0$. Dans la fraction non adsorbée, outre l'hémoglobine, on retrouve la majeure partie de l'activité phosphohexoisomérasique et la totalité de la phosphoglycératokinase. Cette fraction non

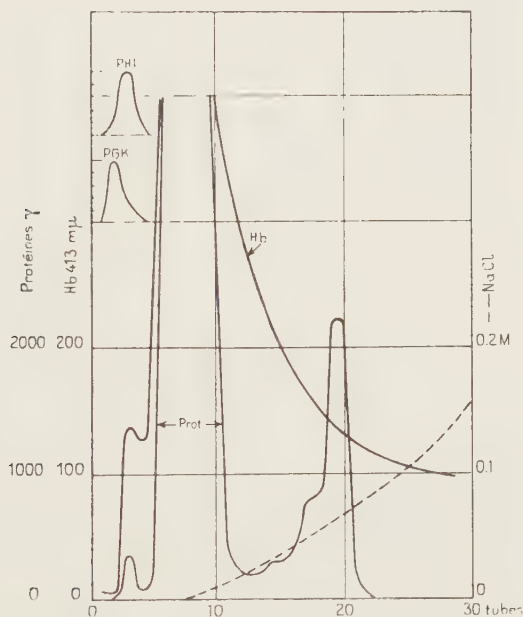


FIG. 3. Séparation chromatographique sur colonne de TEAE, de la fraction non adsorbée à $\text{pH} 7,0$. Elution par gradient Tris/ NaCl à $\text{pH} = 8,5$.

adsorbée sur TEAE cellulose à $\text{pH} 7,0$ est rechromatographiée sur une colonne de TEAE cellulose, tamponnée à $\text{pH} 8,5$ (tampon Tris). En éluant avec un gradient salin de 0 à 0,2 M, les deux enzymes précédents passent avant que n'apparaisse l'hémoglobine, qui n'émerge de

la colonne qu'au début du gradient de NaCl. La phosphoglycératekinase apparaît d'ailleurs plus rapidement que la phosphohexoisomérase (fig. 3).

Dans le groupe des enzymes qui sont élués à faible molarité saline, deux apparaissent presque simultanément (à 0,02 M environ) : la triosephosphate deshydrogénase (d'activité faible) et la triosephosphate isomérase (de très haute activité).

Comme la présence de l'isomérase gêne la détermination des constantes cinétiques de la deshydrogénase, nous avons cherché à améliorer la séparation.

Dans un système Tris pH = 7,0, l'étalement du gradient salin (figure 4) n'améliore pas la séparation des deux enzymes : elle pro-

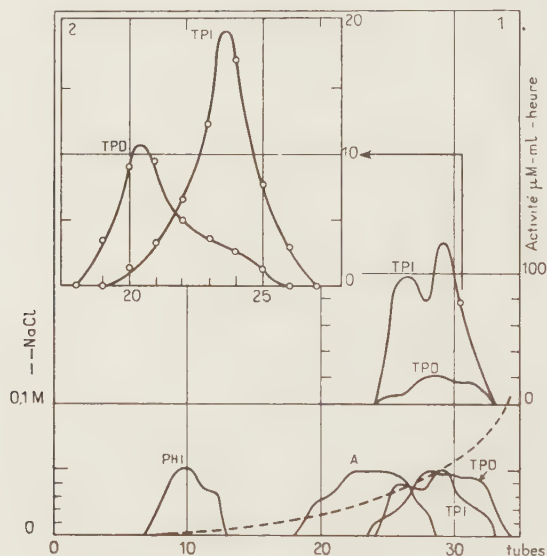


FIG. 4. — (1) Séparation chromatographique sur colonne de TEAE, élution par gradient Tris/NaCl, à pH = 7,0.

Les activités enzymatiques sont exprimées :

- en pourcentage de l'activité maximum (courbes inférieures).
- en activités absolues, par μ mole de substrat transformé, par ml d'éluat et par heure (courbes supérieures).

(2) Rechromatographie de la fraction 31 sur colonne de Sephadex G 200, élution par NaCl 0,5 M en tampon Tris pH 7,0.

voque, en plus du chevauchement, un étalement des pics d'élution. Sur une fraction qui conservait une activité deshydrogénasique encore importante, mais une activité isomérasique déjà faible (fraction 31), nous avons effectué une rechromatographie sur une colonne de Sephadex G 200, en éluant par une solution de NaCl 0,5 M en tampon Tris $3 \cdot 10^{-3}$ M, pH 7,0 : les deux enzymes sont alors suffisamment séparés

TABEAU II.
pH optimum et constantes de Michaelis des enzymes de la glycolyse.

	pH opti- mum	Tampon	K _M substrat	pH	K _M coenzyme	pH	K _M ATP (ou ADP)	pH
Hexokinase	8,25	Tris	Glucose = 5,5.10 ⁻⁵ M	8,1			ATP = 7,7.10 ⁻⁴ M 1.10 ⁻³ M	7,5 8,1
Phosphohexoisomérase	8,40	Tris	F-6-P = 5.10 ⁻⁴ M G-6-P = 2,5.10 ⁻⁴ M	7,5 8,1				
Phosphofructokinase	8,55	Tris	F-6-P = 5,2.10 ⁻⁵ M	8,1			ATP = 1,8.10 ⁻⁵ M	7,5
Aldolase	8,1	Tris	FDP = 1,2.10 ⁻⁵ M	7,5				
Triosephosphate isomérase	8,4	TEA/EDTA	G-3-P = 4.10 ⁻⁴ M	7,5				
Triosephosphate deshydro- génase	8,55 8,6	Tris TEA/EDTA	G-3-P = 7,7.10 ⁻⁵ M	7,5	DPN = 2,8.10 ⁻⁴ M	7,5		
Phosphoglycérate kinase	7,3	Tris TEA/EDTA	3-PG = 2,8.10 ⁻⁴ M	7,5			ATP = 4,3.10 ⁻⁴ M	7,5
Phosphoglycérate mutase	6,70	TEA/EDTA	3-PG = 9.10 ⁻⁴ M	7,5				
Enolase	7,2	TEA/EDTA	2-PG = 6.10 ⁻⁵ M	7,5				
Pyruvate kinase	7,60	TEA/EDTA	PEP = 3,4.10 ⁻⁴ M	7,5			ADP = 1.10 ⁻³ M	7,5
Lactico deshydrogénase	7,2	Tris	Pyr = 9,5.10 ⁻⁵ M	7,5	DPNH = 1,2.10 ⁻⁵ M	7,5		
Glucose-6-Phosphate des- hydrogénase	8,7	Tris	G-6-P = 3.10 ⁻⁵ M	7,5				

pour que la faible activité isomérasique résiduelle (fraction 20 de la figure 4/2) ne gêne plus les déterminations.

Pour tous les enzymes de la chaîne glycolytique ainsi séparés et partiellement purifiés, nous avons établi le pH optimum d'activité et les constantes de Michaelis vis-à-vis des substrats et des coenzymes. Nos résultats figurent dans le Tableau II.

DISCUSSION.

1. Dans les conditions techniques précisées, la reproductibilité des pics d'élution, des courbes de protéines et d'hémoglobuline est excellente. En particulier, les sept fractions protéiques que nous signalons émergent constamment de la colonne aux concentrations en NaCl indiquées.

2. Nous avons déterminé le rendement de la séparation en comparant les activités de chaque enzyme de l'hémolysat initial des globules rouges aux activités de la fraction non adsorbée et des pics d'élution. Les résultats, rassemblés dans le Tableau III, montrent que le rendement exprimé en pourcentage d'activité récupérée est très variable ;

— certains enzymes sont adsorbés en totalité par la TEAE cellulose (LD, G-6-PD, PFK, HK), d'autres sont peu adsorbés (PHI, PGK), d'autres enfin, se répartissent à des degrés divers entre la TEAE cellulose et le surnageant ;

— pour certains, le rendement de récupération est élevé (A, PGK, TPD, LD). D'autres, pour lesquels nous ne retrouvons qu'une faible proportion de l'activité initiale (PFK, PK, E) correspondent à des enzymes très labiles et détruits au cours de la séparation sur colonne, bien que la température ait été maintenue à + 3°, que les enzymes aient été protégés par le mercaptoéthanol et que leur dosage ait été effectué le plus rapidement possible après leur émergence de la colonne.

3. Le rapport (activité par mg de protéine de la fraction purifiée/activité par mg de protéine de l'hémolysat initial — Tableau IV) indique un coefficient de concentration élevé pour la plupart des enzymes étudiés, sauf pour les deux enzymes qui sont peu adsorbés et qui passent avec de l'hémoglobine (dont la présence majeure la teneur en protéine, donc abaisse l'activité spécifique).

C'est à partir de ces fractions partiellement purifiées que nous avons déterminé le pH optimum et les constantes de Michaelis (*). Ces données concernant le globule rouge humain sont peu nombreuses.

(*) Les activités spécifiques de la TPD et de la TPI représentées dans le Tableau IV correspondent au fractionnement initial sur TEAE-cellulose, et les fractions sur lesquelles le pH optimum et la constante de Michaelis ont été établis, obtenues par rechromatographie sur Sephadex G 200 avaient une activité spécifique très supérieure.

TABLEAU III.
Activités enzymatiques du globule rouge normal et rendement de récupération.

Enzymes	Activité en μ moles de substrat converties par ml de globule rouge et par heure		Activité en μ moles de substrat converties par heure et rapportées au ml globule rouge				Pourcentage de récupération	
	TEA, EDTA pH 7,5 Moyenne 10 déterminations $\pm$ s	Tris pH 8,1 Moyenne	Conditions de dosage	Elution colonne	Fraction non adsorbée	Colonne	Colonne + non adsorbée	
Hexokinase.....	9 $\pm$ 3	6	TRIS pH 8,1	2,7	0	45	45	
Phosphohexose isomérase.....	409 $\pm$ 122	422	TRIS pH 8,1	2,1	220	0,005	52	
Phosphofructo kinase.....	49 $\pm$ 15	51	TRIS pH 8,1	15	0	29	29	
Aldolase.....	23 $\pm$ 5	16	TRIS pH 8,1	3	14	19	100	
Triose phosphate isomérase...	16 000 $\pm$ 3 500	7 500	TRIS pH 8,1	742	1 635	10	32	
Triose phosphate deshydrogénése.....	755 $\pm$ 214	870	TEA/EDTA pH 7,5	140	490	18	83	
Phosphoglycérate kinase.....	1 580 $\pm$ 388	1 561	TRIS pH 8,1	0	1 407	0	90	
Phosphoglycérate mutase.....	313 $\pm$ 45	92	TEA/EDTA pH 7,5	81	15	27	31	
Enolase.....	81 $\pm$ 19	46	TEA/EDTA pH 7,5	7	32	9	48	
Pyruvate kinase.....	139 $\pm$ 48	80	TEA/EDTA pH 7,5	17	24	12	30	
Lactico deshydrogénase.....	923 $\pm$ 178	1 280	TRIS pH 8,1	1 058	0	83	83	
Glucose-6-phosphate deshydrogénase.....	83 $\pm$ 14	74	TRIS pH 8,1	51	0	69	69	
6-Phosphogluconate deshydrogénase.....	34 $\pm$ 10	34	TRIS pH 8,1	3,8	22	11	76	

(NB) Certains enzymes sont plus actifs au même pH en tampon TEA, EDTA qu'en tampon Tris : ce sont la triose phosphate isomérase, la phosphoglycérate mutase, l'enolase et la pyruvate kinase. Par contre, la lactico deshydrogénase est plus active en tampon Tris.

TABLEAU IV.

Activités spécifiques et coefficient de purification des divers enzymes après séparation sur TEAE cellulose.

	Activité spécifique		Coefficient de purification	A.S. après TEAE
	Hémolysat initial	Après séparation TEAE cellulose		A.S. HENNESSEY [2]
Hexokinase	0,019	1,8	95	2,5
Phosphohexose isomérase.	0,90	12	13	13
Phosphofructokinase	0,06	6,5	108	3,8
Aldolase.....	0,06	22	367	44
Triose phosphate isomérase	38	3 055	80	18
Triose phosphate deshydrogénase	3,4	267	78	10,8
Phosphoglycérate kinase..	3,9	(394)	101	563
Phosphoglycérate mutase.	0,86	100	116	5,3
Enolase.....	0,20	7,3	37	2,3
Pyruvate kinase	0,3	18	60	3,8
Lactico deshydrogénase...	2,6	450	173	4,9
Glucose-6-P deshydrogénase	0,16	29	181	5,5
6-phosphogluconate deshydrogénase	0,06	16	267	

Mais les valeurs du tableau sont voisines de celles de la littérature, concernant les enzymes de sources différentes.

Dans ces séparations, nous n'avons jamais pu déceler de dissociations en plusieurs pics d'élution des enzymes pour lesquels on connaît plusieurs isoenzymes.

Nous avons cherché à identifier ces isoenzymes dans le cas de la lactico deshydrogénase. Le pic d'élution à 0,09 M NaCl qui correspond à l'activité deshydrogénasique a été préparé en tubes. La répartition des isoenzymes a été déterminée par électrophorèse en gel d'amidon (110 v/cm, pH = 8,4 à + 3° pendant 15 heures) [25].

La figure 5 montre que les divers isoenzymes se répartissent également à tous les niveaux du pic d'activité (*).

4. pH optimum.

Il est intéressant de noter que les six premiers enzymes de la chaîne glycolytique ont un pH optimum aux alentours de 8-8,5, alors que les suivants fonctionnent mieux aux pH plus acides.

(*) Si, dans certaines fractions (21, 23, 24 et 25) certaines bandes semblent absentes, c'est que l'activité globale était faible et que les bandes les plus discrètes dans l'hémolysat et dans la fraction 22 n'apparaissent pas.

Seules, la phosphofructokinase et la triosephosphate deshydrogénase ont une courbe de pH optimum très aiguë. Ce pH est celui de l'ensemble de la glycolyse du globule rouge.

5. Constantes de Michaelis.

Les constantes de Michaelis ont été mesurées spectrophotométriquement par la méthode de dosage qui a été décrite dans le chapitre précédent : la K_m de la phosphofructoisomérase vis-à-vis du G-6-P a pu être mesurée colorimétriquement après incubation de l'enzyme avec du G-6-P à concentrations croissantes et mesure du F-6-P apparu par la réaction colorée de SELIVANOFF.

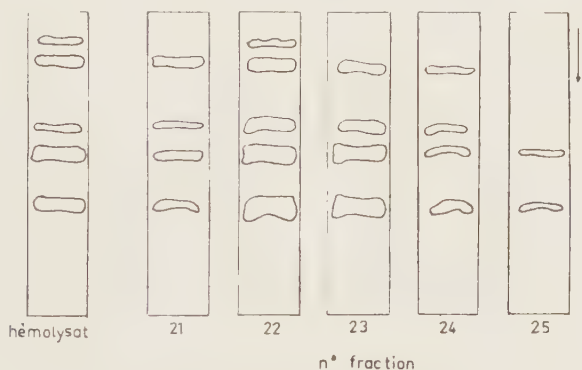


FIG. 5. -- Electrophorèse sur gel d'amidon des isoenzymes de la lactico-deshydrogénase.

A l'exception de la phosphoglycérate kinase (dosée dans le sens $3\text{-PG} \longrightarrow 1,3\text{-DPG}$), les activités ont été mesurées dans le sens de la dégradation du glucose.

Si l'on se réfère aux concentrations en substrats du globule rouge établies par CARTIER et LEROUX [26] dans les conditions les plus physiologiques possibles (prélèvement de sang immédiatement congelé à -20°), 3 enzymes seulement fonctionnent en présence de concentration en substrats supérieure à la valeur de la constante de Michaelis : il s'agit de l'hexokinase, de l'aldolase et de la lactico deshydrogénase. L'activité des autres est peut-être limitée par la très faible concentration en substrat.

La phosphofructokinase a été étudiée plus particulièrement et l'enzyme que nous avons obtenu par adsorption sur TEAE cellulose n'est pas inhibé par l'ATP, ni par le citrate, ni activé par l'AMP.

La lactico deshydrogénase est inhibée par son substrat, le pyruvate, au-dessus de 1.10^{-3} M comme le fait a été signalé pour la lactico deshydrogénase, type « cœur » [27].

Soulignons enfin que les deux enzymes qui sont nécessaires dans les autres tissus à la phase terminale de la néoglycogénèse, en hydrolysant

TABLEAU V.

Nom systématique	Nomenclature I.U.B.	Nom commun	Abréviation
ATP : D-hexose-6-phosphotransférase	2-7-1-1	Hexokinase	HK
D-glucose-6-phosphate cétilisomérase	5-3-1-9	Phosphohexose isomérase	PHI
ATP : D-fructose-6-phosphate-1-phosphotransférase	2-7-1-11	Phosphofructo kinase	PFK
Fructose 1-6 diphosphate-D glycéraldéhyde-3-phosphate-lyase	4-1-2-13	Aldolase	A
D-glycéraldéhyde-3-phosphate : NAD oxidoréductase	1-2-1-12	Triose phosphate deshydrogénase	TPD
D-glycéraldéhyde-3-phosphate cétil-isomérase	5-3-1-1	Triose phosphate isomérase	TPI
ATP : 3 phosphoglycérate-1-phosphotransférase	2-7-2-3	Phosphoglycérate kinase	PGK
2,3-diphospho-D-glycérate : 2-phospho-D-glycérate phosphotransférase	2-7-5-3	Phosphoglycérate mutase	PGM
2-phospho-D-glycérate hydrolyase	4-2-1-11	Enolase	E
ATP : pyruvate phosphotransférase	2-7-1-40	Pyruvate kinase	PK
L-Lactate : NAD oxidoréductase	1-1-1-27	Lactico deshydrogénase	LD
D-glucose-6-phosphate : NADP oxidoréductase	1-1-1-49	Glucose-6-phosphate deshydrogénase	G-6-PD
6-phospho-D-gluconate : NADP oxidoréductase	1-1-1-44	6-phosphogluconate deshydrogénase	6-PGD
1,3 diphospho-D-glycérique acide : 3-phospho-D-glycérate phosphotransférase	2-7-5-4	Diphosphoglycérate mutase	DPGM
Méthémoglobuline : NAD oxidoréductase	1-6-99	Méthémoglobine réductase	MR
Hydrogène peroxide : hydrogène peroxide oxidoréductase ..	1-11-1-6	Catalase	C
L glycéról-3-phosphate : NAD oxidoréductase	1-11-1-8	α -glycérophosphate deshydrogénase	Glycéro P-D
Purine nucléoside : orthophosphate ribosyl transférase	2-4-2-1	Nucléoside phosphorylase	NP
Orthophosphorique monoester phosphohydrolyase	3-1-3-2	Phosphatase acide	P ac

L'hexosediphosphate et l'hexosephosphate, c'est-à-dire la fructose diphosphatase et la glucose-6-phosphatase (*) n'ont pu être décelés. L'absence de ces deux enzymes est en accord avec l'impossibilité, démontrée par CARTIER et LEROUX, dans le globule rouge, de réformer le glucose, soit à partir du pyruvate, soit à partir des termes en C_3 situés en amont du pyruvate (CARTIER et LEROUX) [29].

L'absence de glucose-6-phosphatase est par ailleurs logique, car on sait que dans les autres tissus, cet enzyme est localisé dans la fraction microsomale.

Ce travail a été réalisé grâce à une bourse de Chargée de Recherches de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

SUMMARY.

Human red blood cell glycolytic enzymes are separated and partially purified by chromatographic fractionation on TEAE-cellulose columns.

The crude haemolyzate is first mixed with TEAE cellulose. Washing of the cellulose eliminates haemoglobin, which is not retained at pH 7.0. Cellulose adsorbed enzymes, transferred into a TEAE-cellulose column emerge in the following sequence: aldolase, triose-phosphate dehydrogenase, triose-phosphate isomerase, triose-phosphate dehydrogenase, triose-phosphate isomerase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, phosphoglycerate mutase, hexokinase, lactate dehydrogenase, enolase, pyruvate kinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and phosphofructokinase.

The pH activity curve and Michaelis-constants of every separated enzyme have been established.

However, the two neoglycogenetic phosphohydrolases (glucose-6-phosphatase and fructose-di-phosphate phosphatase) could be detected neither in the crude haemolyzate nor in the elution fractions.

ZUSAMMENFASSUNG.

Durch Trennung an TEAE-Zellulose-Säulen in Salzgradient wurden die glykolytischen Enzymen des menschlichen roten Blutkörperchen teilweise gereinigt.

Durch eine erste Adsorption auf TEAE-Zellulose wird das bei pH 7,0 nicht adsorbierbare Hämoglobin aus dem Hämolysat beseitigt. Die Enzyme, die wiederum an einer TEAE-Zellulose-Säule chromatographiert werden, erscheinen in der folgenden Ordnung: Aldolase, Triosephosphat-Dehydrogenase, Triosephosphat-Isomerase, 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase, Phosphoglycerat-Mutase, Hexokinase, Laktat-Dehydrogenase, Enolase, Pyruvat-Kinase, Glukose-6-Phosphate-Dehydrogenase und Phosphofruktokinase.

Die bei pH 7,0 nicht absorbierte Fraktion wurde an TEAE-Zellulose, die bei pH 8,5 gepuffert war, wieder chromatographiert, wodurch die Phosphohexose-Isomerase und die Phosphoglycerat-Kinase getrennt werden.

Die spezifische Aktivität der Fraktionen entspricht einer beträchtlichen Reinigung, die für zehn auf dreizehn Enzyme zwischen 60 und 370 mal die spezifische Aktivität des Hämolysats beträgt. Mit jedem auf diese Weise ge-

(*) ROSE et O'CONNEL [28] ont également constaté par des mesures directes et indirectes l'absence de glucose-6-phosphatase dans le globule rouge.

reinigtem Enzym wurde die Optimum-pH-Kurve und die Michaelis-Konstante der Substrate und der Coenzyme bestimmt.

Die beiden für das Neoglukogenese-System charakteristischen Phosphatasen (Glukose-6-Phosphatase und Fruktose-Diphosphat-Phosphatase) konnten weder im Hämolysat, noch in den Elutionfraktionen nachgewiesen werden.

BIBLIOGRAPHIE.

1. HUENNEKENS, F., LIU, L., MYERS, A. et GABRIO, B. — *J. Biol. Chem.*, 1957, **227**, 253.
2. HENNESSEY, M. A., WALTERSDORPH, A. et HUENNEKENS, F. — *J. Clin. Invest.*, 1962, **41**, 1257.
3. BOCK, R. et NAN SING LING. — *Anal. Chem.*, 1954, **26**, 1453.
4. MOORE BLAKE, W. et LEE, R. H. — *J. Biol. Chem.*, 1960, **235**, 1359.
5. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. et RANDALL, R. J. — *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265.
6. OESPER, P. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, **95**, 237.
7. OHLMEYER, P. — *J. Biol. Chem.*, 1951, **190**, 21.
8. LEROUX, J. — Thèse de doctorat en médecine, Paris, 1965.
9. RACKER, E. — *J. Biol. Chem.*, 1947, **167**, 843.
10. SREBE, P., COOPER, J. R., TABACHNICK, M. et RACKER, E. — *Arch. Biochem.*, 1958, **74**, 295.
11. WU, R. et RACKER, E. — *J. Biol. Chem.*, 1959, **234**, 1029.
12. VELICK, S. F. — « *Methods in Enzymology* », vol. I, Academic Press, New-York, 1955, 401.
13. MEYER-ARENDT, E., BEISENHERTZ, G. et BUCHER, T. — *Naturwissenschaften*, 1953, **40**, 59.
14. BUCHER, T. — *Methods in Enzymology*, vol. I, Academic Press, New-York, 1955, 415.
15. CHAPMAN, R. G., HENNESSEY, M. A., WALTERSDORPH, A. M., HUENNEKENS, F. M. et GABRIO, B. W. — *J. Clin. Invest.*, 1962, **41**, 1249.
16. BUCHER, T. et PFLEIDERER, C. — « *Methods in Enzymology* », vol. I, Academic Press, New-York, 1955, 435.
17. KUROWITZ, F. et OTT, P. — *Biochem. Z.*, 1943, **314**, 94.
18. KORNBERG, A. et HORECKER, B. L. — « *Methods in Enzymology* », vol. I, Academic Press, New-York, 1955, 323.
19. HORECKER, B. L. et SMYRNIOTIS, P. Z. — *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 371.
20. RAPOPORT, S. et LUEBERING, J. — *J. Biol. Chem.*, 1952, **196**, 583.
21. HUENNEKENS, F. M., CAFFREY, R. W., BASFORD, R. E. et GABRIO, B. W. — *J. Biol. Chem.*, 1957, **227**, 261.
22. PRICE, V. E., OTEY, M. C. et PLESNER, P. — « *Methods in Enzymology* », vol. II, Academic Press, New-York, 1955, 448.
23. BEERS, R. F. et SIZER, I. W. — *J. Biol. Chem.*, 1952, **195**, 133.
24. BESSEY, O. A., LOWRY, O. H. et BROCK, M. J. — *J. Biol. Chem.*, 1946, **164**, 321.
25. POULIK, M. D. — *Nature*, 1957, **180**, 1477.
26. CARTIER, P. et LEROUX, J. P. — *Compte rendu des 8^e Journées biochimiques latines*, Lisbonne, (20-24 septembre 1965), page 83.
27. KAPLAN, N. O. et CAHN, R. D. — *Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.*, 1962, **48**, 2123.
28. ROSE, I. A. et O'CONNELL, E. L. — *J. Biol. Chem.*, 1964, **239**, 12.
29. CARTIER, P. et LEROUX, J. P. — Communication personnelle.

TECHNIQUES DE DOSAGE DES INTERMÉDIAIRES DE LA GLYCOLYSE DANS LES TISSUS

Par P. CARTIER, J.-P. LEROUX et H. TEMKINE

INTRODUCTION

Pour explorer la glycolyse d'un tissu, nous pouvons exprimer son intensité globale par la quantité de glucose consommé et de lactate formé *in vitro*, dans des conditions expérimentales déterminées. Des renseignements déjà plus complets (par exemple, localisation des réactions limitantes d'un système) nous sont fournis par la mesure de l'activité des divers enzymes qui jalonnent la voie d'Embden Meyerhof. Nous en avons récemment décrit les techniques et leur application à l'étude de la glycolyse tissulaire [1].

Mais le dosage des enzymes de la glycolyse ne donne qu'une image très imparfaite des conditions de fonctionnement de cette chaîne métabolique. Car ce n'est pas la vitesse maximale des enzymes (définie « *in vitro* » dans les conditions optimales) qui règle l'intensité du processus glycolytique, mais l'activité réelle de ces enzymes dans la cellule, telle qu'elle est contrôlée (directement ou par effet allostérique) par le taux des coenzymes et des substrats.

Donc, si l'on veut réaliser une exploration plus complète de la glycolyse, il importe de connaître la concentration des substrats intermédiaires et des coenzymes. Par exemple, en calculant, pour chaque étape enzymatique, le rapport des deux termes de la réaction et en le comparant à la constante d'équilibre déterminée « *in vitro* », il est possible de localiser la réaction limitante dans les conditions expérimentales choisies : il a été ainsi démontré que la phospho-fructo-kinase constitue l'enzyme limitant de la glycolyse du globule rouge aux pH inférieurs à 8 : les substrats de la voie d'Embden Meyerhof s'accumulent en amont et diminuent en aval de ce « cross-over point » [2].

L'emploi de préparations commerciales d'enzymes et de substrats purifiés et standardisés a favorisé l'application des méthodes spectrophotométriques qui utilisent les variations de densité optique dans le proche ultraviolet des formes oxydées ou réduites des pyridine-nucléotides (NAD ou NADP), principe analogue à celui qui est appliqué à la mesure des activités enzymatiques [1].

Ces méthodes relativement simples sont d'une reproductibilité satisfaisante et d'une grande spécificité. Leur sensibilité, déjà très élevée dans la variante spectrophotométrique la plus simple, et qui permet de déterminer des quantités de substrats de l'ordre de 10^{-8} mole, peut être encore accrue par l'emploi de techniques de mesure fluorométrique (10^{-11} moles).

En réalité, dans le dosage des substrats intermédiaires de la glycolyse, la difficulté ne réside pas dans les techniques de dosage proprement dites, mais dans les conditions du prélèvement tissulaire et de son extraction. Le taux des substrats intermédiaires se modifie instantanément lorsque les conditions du prélèvement ne sont pas étroitement standardisées : il suffit de consulter les travaux de DALE [3, 4] qui analysent les conditions locales du prélèvement tissulaire et mettent en lumière l'influence du mode d'anesthésie et la manière de tuer l'animal, pour se rendre compte des difficultés considérables auxquelles se heurte le dosage des substrats intermédiaires d'une chaîne métabolique. Les conditions du prélèvement tissulaire doivent être codifiées d'une manière très rigoureuse pour que les concentrations des divers intermédiaires de la chaîne métabolique fournissent une image significative de l'état dynamique permanent.

Deux principes essentiels doivent être respectés :

- 1) l'état d'équilibre physiologique du tissu ne doit pas être modifié au moment du prélèvement. En particulier, éviter l'anoxie tissulaire et l'agitation du sujet.
- 2) l'équilibre physiologique doit être figé instantanément au moment du prélèvement : ce qui n'est réalisable que par une congélation « in situ » très rapide à très basse température.

Il est bien évident que, en dehors de l'expérimentation animale, les conditions précédentes ne sont pas réalisables entièrement chez l'homme. Les prélèvements post-mortem sont inutilisables. Avec les prélèvements opératoires ou les biopsies, la congélation n'est pas parfaitement instantanée. Seul le sang peut être prélevé dans les conditions optimales.

Nous précisons d'abord les conditions du prélèvement tissulaire. Nous discuterons ensuite la technique d'extraction des intermédiaires de la glycolyse. Nous terminerons par l'exposé des techniques de dosage que nous utilisons depuis plusieurs années [2, 5].

I. — LE PRÉLÈVEMENT TISSULAIRE

La mort et l'arrêt circulatoire qui en résulte produisant des modifications importantes de l'équilibre des intermédiaires de la glycolyse, le prélèvement doit être réalisé sur l'animal anesthésié.

Le mode d'anesthésie choisi n'est pas indifférent [3]. L'éther provoquant un certain degré d'anoxie, nous préférons pratiquer une injection intrapéritonéale de mébubarbital (5 mg pour 100 g de poids). L'organe est abordé et un fragment est prélevé à l'aide d'une pince plate spéciale (*) préalablement refroidie dans l'azote liquide, et les fragments qui débordent de la pince sont éliminés. Le fragment congelé est broyé dans un mortier métallique d'Abich. La pastille congelée est rapidement pesée, suspendue à un crochet métallique refroidi. La pastille est pulvérisée dans un mortier en porcelaine, refroidi à l'azote liquide. Cette poudre est immédiatement extraite.

(*) Divers modèles de pinces à congeler ont été décrits [4, 6] : nous utilisons un modèle en aluminium, réalisé à peu de frais, avec une pince à rats du commerce.

II. — LA PRÉPARATION DES EXTRAITS

Le choix de l'agent de défécation n'est pas indifférent. Il doit répondre à un double but :

- extraire quantitativement les intermédiaires à doser ;
- inactiver rapidement les activités enzymatiques sans gêner ultérieurement les dosages.

L'acide trichloracétique est un excellent agent d'extraction que l'on peut éliminer ensuite en majeure partie (mais non totalement) par entraînement dans l'éther ou mieux encore dans l'acétate de butyle [7]. Mais l'ion trichloracétate inhibe la glucose-6-phosphate déshydrogénase, ce qui l'exclut comme réactif de défécation dans les techniques enzymatiques.

L'acide perchlorique (PCA) est l'agent d'extraction le mieux adapté. Avec PCA 0,6 N, à condition de respecter un rapport minimal (volume PCA/poids de tissu), l'extraction tissulaire est complète.

BUCHER et HOHORST [8] proposent pour ce rapport une valeur optimale de 8, voisine de celle que nous utilisons pour les tissus parenchymateux. Nous avons toutefois constaté que l'extraction est déjà complète avec des volumes plus faibles de PCA 0,6 N : en particulier, dans le cas du globule rouge, dans la technique que nous proposons, le rapport final n'est que 4 environ (*).

L'ion perchlorate est facilement éliminé par neutralisation de l'extrait (solution de potasse, CO_3HK ou CO_3K_2 cristallisés).

1. Sang total humain.

On tare un tube à centrifuger de 50 ml contenant un agitateur et 20 ml d'acide perchlorique 1,2 M (soit 10 ml de PCA Merck d = 1,67 pour 100 ml). Le tube est plongé dans la glace et environ 20 ml de sang sont recueillis à l'aiguille à plateau en évitant la stase sous agitation continue très efficace. Le tube est à nouveau pesé. L'hématocrite et la densité sont par ailleurs déterminés sur le même sang (prélevé sur héparine). Ces données (poids de sang, hématocrite et densité) permettent de calculer le volume des globules rouges prélevé. Toutes les opérations ultérieures sont réalisées à 0°C. L'extrait perchlorique est centrifugé 10 minutes à 3 000 t/mn. Le culot est lavé trois fois avec 15 ml d'acide perchlorique 0,6 N et les surnageants sont réunis et après 15 minutes de contact (**) neutralisés avec une solution de KOH saturée (jusqu'à pH 6 au maximum). Le perchlorate de potassium est éliminé par centrifugation et l'extrait est lyophilisé et amené à un volume de 25 ml.

(*) Pour MINAKAMI et coll. [9], 2 volumes de PCA 0,6 N suffisent pour extraire complètement les intermédiaires glycolytiques du globule rouge.

(**) Ce temps de contact est nécessaire pour détruire les enzymes. Bien que MAIRNA et ESTABROOK signalent que certains enzymes se réactivent à la neutralisation (en particulier aldolase et phospho-glycérate mutase), nous n'avons pas constaté d'activités résiduelles sur l'extrait perchlorique neutralisé [10].

2. Poudre congelée de tissus parenchymateux.

A 1 g de tissu pulvérisé, maintenu dans un mortier en porcelaine à la température de l'azote liquide, on ajoute environ 2,5 ml d'acide perchlorique 3 N froid qui congèle immédiatement. Le mortier est alors placé dans un bain d'éthanol à -10°C , et l'extrait est rendu homogène par agitation au pilon pendant une dizaine de minutes. Après addition de 7,5 ml d'eau bidistillée refroidie, qui provoque la décongélation, l'extrait est aussitôt transféré dans un broyeur de Potter et homogénéisé. Après un contact de 15 minutes, l'extrait est centrifugé (3 000 g/10 minutes), le culot est lavé par 2 ml d'acide perchlorique 0,3 N, les surnageants réunis sont neutralisés (pH 6) par KOH saturée ou CO_3HK solide, et complétés à 10 ml. Après 20 minutes de contact, le perchlorate est éliminé par centrifugation et le surnageant conservé à 0°C .

III. — MÉTHODES DE DOSAGE

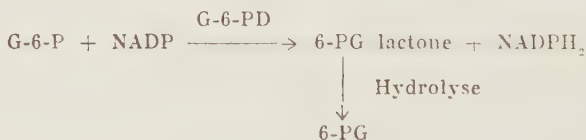
1. Principe général.

Toutes les techniques de dosage se rattachent à un même principe proposé par WARBURG : le substrat est transformé quantitativement par un ou plusieurs enzymes comportant une déshydrogénase à NAD (ou à NADP) et la disparition du substrat se traduit par l'oxydation ou la réduction d'une quantité égale de pyridine-nucléotides. L'oxydo-réduction des pyridine-nucléotides est suivie au spectrophotomètre 340 ou 366 nm.

Deux cas sont possibles :

a) Le substrat peut être directement transformé par une déshydrogénase à pyridine-nucléotides : en présence d'un excès d'enzyme et de coenzyme, et dans la mesure où, dans les conditions du dosage, la réaction déshydrogénasique est pratiquement irréversible, la variation de densité optique permet de calculer la quantité de substrat initialement présente.

Par exemple, le glucose-6-phosphate sera dosé en présence d'un excès de NADP et de G-6-PD.



b) Le substrat n'est pas lui-même sensible à une déshydrogénase, mais à un enzyme d'appoint qui le transforme en un autre intermédiaire métabolique à son tour oxydé ou réduit par une déshydrogénase à NAD (ou NADP).

Par exemple, le phospho-énol-pyruvate sera dosé en présence d'ADP, de pyruvate-kinase, de lactico-déshydrogénase et de NADH_2 en excès :



Il est possible, en ajoutant successivement les enzymes d'une portion de la chaîne glycolytique, de doser une séquence de plusieurs substrats dans une même cuve : ainsi, pyruvate, phospho-énol-pyruvate, 2-phospho-glycérate et 3-phospho-glycérate seront dosés en ajoutant successivement lactico-déshydrogénase, pyruvate-kinase, éno-lase et phospho-glycérate mutase.

Deux conditions sont indispensables pour que les réactions soient quantitatives :

a) les préparations enzymatiques doivent être hautement purifiées (de manière à ne pas introduire de réactions parasites) et d'une grande activité spécifique. (la réaction doit être totale en moins de cinq minutes).

b) la réaction déshydrogénasique finale doit être pratiquement irréversible. C'est le cas des trois enzymes utilisés (G 6 PD, CPD, LD) dans les conditions de leur emploi (*).

2. Conditions de milieu du dosage.

Le problème est très différent de celui qui se pose pour les dosages enzymatiques. Ici, il importe seulement que la réaction évolue suffisamment vite et jusqu'à son terme : le pH, la température et la force ionique du milieu du dosage, s'ils doivent être bien fixés, ne présentent pas la même importance que lorsqu'on mesure une cinétique enzymatique.

Toutefois, le choix du tampon n'est pas indifférent : en particulier, le TRIS qui se combine à certains substrats (aldéhydes et cétones en particulier) doit être proscrit. Nous utilisons un tampon Triéthanolamine à pH 7,6 additionné d'EDTA (en raison de son rôle protecteur sur les enzymes). Les dosages sont effectués à la température du laboratoire.

3. La mesure spectrophotométrique.

Le choix de l'appareillage spectrophotométrique a été discuté précédemment [1]. Nous utilisons un photomètre Eppendorf à lampe Hg, dont nous exploitons la raie Hg à 366 nm.

L'enregistrement automatique présente ici encore d'importants avantages : il permet d'apprécier la vitesse des réactions et déterminer avec précision le moment où le substrat est totalement épuisé.

Dans tous les cas, le protocole de dosage est identique : les réactifs-substrats, coenzymes et la prise d'essai sont introduits dans une cuve de 1 cm de trajet optique et le volume final est amené à 3 ml avec l'eau bidistillée. Après agitation, l'enregistrement est mis en route de façon à établir la ligne de base. L'enzyme déclenchant est déposé sur l'agitateur et introduit en dernier. On laisse la réaction évoluer jusqu'à l'obtention d'un plateau horizontal stable.

(*) Une exception notable : le dosage de l'acide lactique (cf. p. 804).

4. Calcul.

Le coefficient d'extinction molaire du NADH_2 (et du NADPH_2) étant de :

$$6,22 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 / \text{mole à } 340 \text{ nm } (*)$$

$$3,30 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 / \text{mole à } 366 \text{ nm}$$

La quantité de substrat introduite dans la cuve (exprimée en nmoles) est :

$$\Delta E_{310} \times 1\,000 \times \frac{\text{Volume de cuve (ml)}}{6,22}$$

$$6,22$$

$$\text{ou } \Delta E_{366} \times 1\,000 \times \frac{\text{Volume de cuve (ml)}}{3,30}$$

$$3,30$$

Si, par exemple, pour une prise d'essai de 2 ml d'un extrait globulaire au tiers, on trouve une ΔE de 0,050, à 366 nm, la cuve contient :

$$0,050 \times 1\,000 \times \frac{3}{3,3} = 45,4 \text{ nmoles de substrat } (*)$$

et le résultat pourra s'exprimer :

$$45,4 \times \frac{3}{2} = 68,2 \text{ nmoles/ml de globules rouges.}$$

Le photomètre Eppendorf possède un dispositif d'amplification sur l'enregistreur de sorte que, sur la gamme de sensibilité la plus élevée, 10 nmoles dans une cuve de 3 ml correspondent à environ 1 cm de déflexion sur le papier d'enregistrement. Dans ces conditions, les prises d'essai optimales seront choisies (si possible) de façon à ce que 20 à 200 nmoles de substrat à doser soient présentes dans la cuve de dosage.

IV. — LES TECHNIQUES DE DOSAGE

1. Réactifs (tableau I).

Les remarques générales concernant les réactifs sont identiques à celles que nous avons faites pour le dosage des enzymes [1]. A l'état congelé, les solutions de NAD, NADP se conservent pendant plusieurs semaines. Au contraire, les solutions de NADH_2 sont instables et ne sont jamais conservées à l'état congelé plus de deux jours.

2. Les techniques.

Lorsque nous déterminons l'ensemble des dérivés intermédiaires de la glycolyse,

(*) 1 nmole (nanomole) = 1 μmole (soit 10^{-9} mole).

1 nm (nanomètre) = 1 μ (soit 10^{-9} mètre).

l'ordre des dosages que nous suivons habituellement (et qui est celui dans lequel nous le présentons) tient compte :

— d'une part, de la faible stabilité des trioses phosphates et du pyruvate dans l'extrait ;

— d'autre part, du groupage pratique de certains réactifs (réactions à NAD, puis réactions à NADP).

La stabilité du lactate et sa technique de dosage un peu différente (cinétique de longue durée) nous le fait déterminer généralement en dernier.

Les précautions que nous avons indiquées dans le paragraphe « Techniques » du dosage des enzymes [1] concernant la mesure et l'ordre d'addition des réactifs s'appliquent évidemment au dosage des intermédiaires de la glycolyse.

En particulier, nous rappelons que les volumes des réactifs sont indiqués en μ l, et que les chiffres entre parenthèses précisent la quantité totale d'enzyme introduite dans la cuve, exprimée en unités internationales.

ABRÉVIATIONS

Réactifs :

Acide éthylène-diamine-tétracétique : EDTA.

Éthylène-diamine-tétracétate, sel disodique : EDTA Na_2H_2 .

Acide perchlorique : PCA.

Triéthanolamine : TEA.

Tris-hydroxyméthyl-amino-méthane : TRIS.

Substrats :

Dihydroxy-acétone-phosphate : DHAP.

1,3-diphospho-glycérate : 1,3-DPG.

2,3-diphospho-glycérate : 2,3-DPG.

Fructose-6-phosphate : F-6-P.

Fructose-1,6-diphosphate : F-1,6-DP.

Glucose : Glu.

Glucose-1-phosphate : G-1-P.

Glucose-6-phosphate : G-6-P.

Glucose-1,6-diphosphate : G-1,6-DP.

Glycéraldéhyde-3-phosphate : GAP.

L- α -Glycéro-phosphate : Glycéro P.

Lactate : Lact.

Phospho-énol-pyruvate : PEP.

6-Phospho-gluconate : 6-PG.

2-Phospho-glycérate : 2-PG.

3-Phospho-glycérate : 3-PG.

Pyruvate : Pyr.

Coenzymes :

Acide adénosine-monophosphorique : AMP.

Acide adénosine-diphosphorique : ADP.

Acide adénosine-triphosphorique : ATP.

Nicotinamide-adénine-dinucléotide : NAD.

Nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit : NADH_2 .

Nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate : NADP.

Nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate réduit : NADPH_2 .

Enzymes :

Voir tableau I.

TABLEAU I

RÉACTIFS	RÉAC- TIF N°	ORI- GINE	PM	CONCEN- TRATIONS		NB
				mM	mg/ml	
1) Milieux et effecteurs						
Tampon pH 7,60 { TEA base EDTA Na ₂ H ₂	1		149,2	500	74,6	a
			372,3	50	18,6	
Tampon pH 9,5 { Glycocolle Chlorhydrate de semicarbazide EDTA Na ₂ H ₂	2		75	1000	75	b
			111,5	200	22	
			372,3	5,4	2	
KCl	3		74,55	750	55,9	
MgCl ₂	4		203,3	600	122	
2) Substrats						
Glucose	5		180,2	52,5	9,46	
Phospho-Enol-Pyruvate (sel de tricyclohexylammonium)	6	B	465,6	52,5	24,4	
3) Coenzymes						
Adénosine-Triphosphate ATP-Na ₂ , 3 H ₂ O	7	P	605,2	52,5	31,8	c
Adénosine-Diphosphate ADP-Na ₃	8	P	493,2	52,5	25,91	d
Nicotinamide-adénine-dinucléotide NAD acide libre	9	P	700	70	50	e
Nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit NADH ₂ -Na ₂	10	P	709	15	10,6	d, f
Nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit, sans AMP	11	P	709	3	2	g
Nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate NADP-Na	12	P	765	15	11,5	e

TABLEAU I (suite)

		NOMENCLATURE I.U.B.	RÉACTIF N°	N° BOEHRINGER	ACTIVITÉ (en U.I.)	
					PAR mg D'ENZYME	PAR ml DE SUSPENSION
4) <i>Enzymes</i>						
Aldolase	ALDO	4-1-2-13	13	15419	9	90
Énolase	ENO	4-2-1-11	14	15327	27	270
Glucose-6-Phosphate déshydrogénase	G-6-PD	1-1-1-49	15	15303	140	140
Glycéro-phosphate déshydrogénase	GPD	1-1-1-8	16	15135	36	360
Hexokinase	HK	2-7-1-1	17	15431	140	280
Lactico-déshydrogénase	LD	1-1-1-27	18	15145	360	3600
Myokinase	MK	2-7-4-3	19	15187	45	225
Phospho-glycérate mutase	PGM	2-7-5-3	20	15432	18	180
Phospho Hexo Isomérase	PHI	5-3-1-9	21	15433	390	780
Phospho Hexo Mutase	PHM	2-7-5-1	22	15340	5,5	13
Phosphotriose Isomérase	PTI	5-3-1-1	23	16333	2400	4800
Pyruvate Kinase	PK	2-7-1-40	24	15744	125	1250

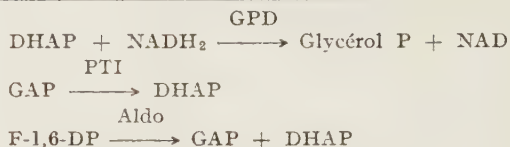
Origine : B Boehringer

P Pabst

- TEA, base (redistillée sous vide). Ajuster le tampon à pH 7,60 avec HCl 2 N.
- Dissoudre dans 30 ml de NaOH 2 N, et compléter à 100 ml avec de l'eau bidistillée : le pH doit être 9,5.
- Amener à pH 8 environ avec NaHCO_3 .
- Dissoudre dans NaHCO_3 1 %.
- Amener à pH 6 environ avec NaHCO_3 .
- La solution ne doit pas être conservée plus de deux jours.
- L'AMP est éliminé du NADH_2 par hydrolyse phosphatase (11). 10 mg de $\text{NADH}_2 \cdot \text{Na}_2$ sont dissous dans 3 ml d'un tampon Triéthanolamine-HCl 0,1 M (pH 8,2) puis incubés à 37° pendant 5 minutes en présence de 100 μg de phosphatase bactérienne alcaline de type III (Sigma). La réaction est arrêtée par addition de 0,4 ml de KOH (N) suivie d'une incubation de 5 minutes à 37° C. La solution est ensuite amenée à pH 8,2 (HCl) et complétée à 5 ml avec le tampon Triéthanolamine 0,1 M (pH 8,2).

1) PHOSPHO-DIHYDROXY-ACÉTONE, GLYCÉRALDÉHYDE-3-PHOSPHATE, FRUCTOSE DIPHOSPHATE

Principe.

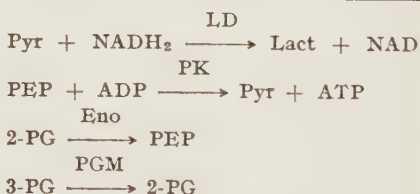


Dosage.

		N°	Concentration réactifs (mM)	Volume dans la cuve	Concentration finale (mM)
Tampon	TEA	(1)	500	300	50
	EDTA	(10)	50		5
NADH ₂			15	50	0,25
Extrait + Eau				2 650	
Établir la ligne de base, puis ajouter :					
GPD		(16)	360 UI/ml	10	(3,6 UI)
	La Δ E observée correspond au DHAP				
PTI		(23)	4 800 UI/ml	5	(24 UI)
	La Δ E observée correspond au GAP				
Aldo		(13)	90 UI/ml	10	(0,9 UI)
	La Δ E observée, divisée par deux, correspond au F-1,6-DP				

2) PYRUVATE, PHOSPHO-ÉNOL-PYRUVATE, 2-PHOSPHO-GLYCÉRATE, 3-PHOSPHO-GLYCÉRATE

Principe.



Dosage.

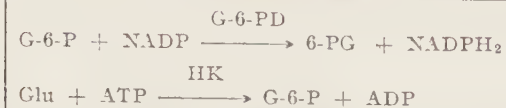
		N°	Concentration réactifs (mM)	Volume dans la cuve	Concentration finale (mM)
Tampon	TEA	(1)	500	300	50
	EDTA	(4)	50		5
MgCl ₂		(3)	600	50	10
KCl		(8)	750	200	50
ADP		(10)	52,5	200	3,5
NADH ₂			15	50	0,25
Extrait + Eau				2 200	
Établir la ligne de base, puis ajouter :					
LD		(18)	3 600 UI/ml	5	(18 UI)
	La Δ E observée correspond au Pyr				
PK		(24)	1 250 UI/ml	5	(6,2 UI)
	La Δ E observée correspond au PEP				
Eno		(14)	270 UI/ml	10	(2,7 UI)
	La Δ E observée correspond au 2-PG				
PGM		(20)	180 UI/ml	10	(1,8 UI)
	La Δ E observée correspond au 3-PG				

Observations.

Il ne faut attacher aucune valeur aux dosages de pyruvate effectués sur un extrait perchlorique lyophilisé, la lyophilisation entraînant d'énormes pertes de ce substrat.

3) ADÉNOSINE-TRIPHOSPHATE

Principe.

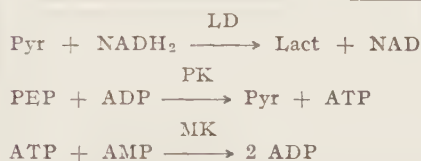


Dosage.

	N°	Concentration réactifs (mM)	Volume dans la cuve	Concentration finale (mM)
Tampon TEA	(1)	500	300	50
EDTA	(4)	50		5
MgCl ₂	(12)	600	50	10
NADP	(5)	15	100	0,5
Glu	(15)	52,5	200	3,5
Extrait + Eau			2 350	
G-6-PD	(17)	140 UI/ml	10	(1,4 UI)
Établir la ligne de base, puis ajouter :				
HK	(17)	280 UI/ml	10	(2,8 UI)
La Δ E observée correspond à l'ATP				

4) ADÉNOSINE-DIPHOSPHATE, ADÉNOSINE-MONOPHOSPHATE

Principe.



Dosage.

	N°	Concentration réactifs (mM)	Volume dans la cuve	Concentration finale (mM)
Tampon TEA	(1)	500	300	50
EDTA	(4)	50		5
MgCl ₂	(3)	600	50	10
KCl	(11)	750	200	50
NADH ₂ sans AMP	(6)	3	200	0,2
PEP	(18)	52,5	200	3,5
Extrait + Eau			2 050	
LD	(24)	3 600 UI/ml	5	(18 UI)
Établir la ligne de base, puis ajouter :				
PK	(19)	1 240 UI/ml	5	(6,2 UI)
La Δ E observée correspond à l'ADP				
MK	(19)	225 UI/ml	10	(2,2 UI)
La Δ E observée, divisée par deux, correspond à l'AMP				

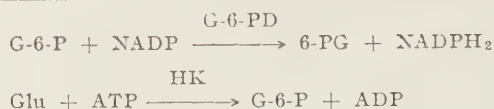
Observations.

Lorsque le dosage est effectué sur un extrait tissulaire ou globulaire, la quantité d'ATP présente est suffisante pour phosphoryler l'AMP.

Si l'on désire doser l'AMP dans un milieu exempt d'ATP, il faut rajouter dans la cuve une quantité d'ATP égale à au moins 10 fois la quantité d'AMP présumée de la prise d'essai. Une cuve témoin contenant l'ATP, mais non l'AMP de la prise d'essai, permet de déterminer l'AMP contaminant : l'AMP de la prise d'essai est égal à l'AMP total (cuve dosage) moins l'AMP de l'ATP (cuve témoin).

5) GLUCOSE

Principe.

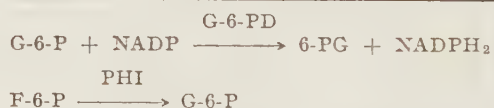


Dosage.

	N°	Concentration réactifs (mM)	Volume dans la cuve	Concentration finale (mM)
Tampon TEA	(1)	500	300	50
EDTA	(4)	50		5
MgCl ₂	(7)	600	50	10
ATP	(12)	52,5	200	3,5
NADP		15	100	0,5
Extrait + Eau	(15)	140 UI/ml	2 350	
G-6-PD			10	(1,4 UI)
Établir la ligne de base, puis ajouter :				
HK	(17)	280 UI/ml	10	(2,8 UI)
La Δ E observée correspond au Glucose				

6) GLUCOSE-6-PHOSPHATE, FRUCTOSE-6-PHOSPHATE

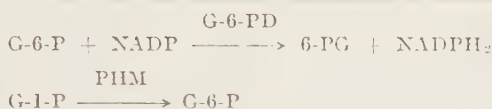
Principe.



Dosage.

	N°	Concentration réactifs (mM)	Volume dans la cuve	Concentration finale (mM)
Tampon TEA	(1)	500	300	50
EDTA	(12)	50		5
NADP		15	100	0,5
Extrait + Eau			2 600	
Établir la ligne de base, puis ajouter :				
G-6-PD	(15)	140 UI/ml	10	(1,4 UI)
La Δ E observée correspond au G-6-P				
PHI	(21)	780 UI/ml	5	(3,9 UI)
La Δ E observée correspond au F-6-P				

7) GLUCOSE-1-PHOSPHATE

Principe.*Dosage.*

Tampon TEA
EDTA

MgCl₂

NADP

Extrait + Eau

G-6-PD

PHM

Établir la ligne de base, puis ajouter :

(22) 13 UI/ml

La Δ E observée correspond au G-1-P

N°	Concentration réactifs (mM)	Volume dans la cuve	Concentration finale (mM)
(1)	500	300	50
(4)	50		5
(12)	600	50	10
	15	100	0,5
(15)	140 UI/ml	2 550	
		10	(1,4 UI)
(22)	13 UI/ml	20	(0,26 UI)

Observations.

a) Dans les extraits de globule rouge, le G-1-P, présent en trop faible quantité, n'est pas décelable par cette technique.

b) Si le dosage est pratiqué non sur un extrait tissulaire, mais sur une solution de G-1-P très purifiée, il faut ajouter dans la cuve 20 µl de glucose-1,6-diphosphate 10⁻² M.

Pour illustrer ces techniques, nous reproduisons (fig. 2, 3 et 4) les enregistrements du dosage du groupe 2 (Pyr, PEP, 2-PG et 3-PG), du dosage de l'ATP (technique 3) et du dosage de l'ADP et AMP (technique 4).

3. Les causes d'erreurs.

Les méthodes enzymatiques se substituent de plus en plus aux méthodes colorimétriques classiques pour le dosage des substrats biologiques. Ces dernières ont une spécificité très limitée : le dosage d'un composé défini n'est généralement réalisable que sur une fraction pure isolée par des techniques laborieuses, comme la chromatographie. Par ailleurs, leur sensibilité est souvent insuffisante et pour la plupart des intermédiaires de la voie d'Embden Meyerhof, leur concentration ne permet pas un dosage colorimétrique direct.

Spécificité très étroite, sensibilité élevée et bonne précision constituent les avantages des méthodes enzymatiques. Mais leur simplicité de réalisation ne doit cependant pas faire oublier certaines causes d'erreur qu'il est indispensable de rap-

8) ACIDE LACTIQUE

Principe.*Dosage.*

	N°	Concentration réactifs (mM)	Volume dans la cuve	Concentration finale (mM)
Tampon pH 9,5 Glycocolle Chlorhydrate de semicarbazide EDTANa ₂ H ₂		1 000		840
	(2)	200	1 400	170
		5,4		4,5
			200	
Extrait + Eau	(9)	70	50	2,1
NAD	(18)	3 600 UI/ml	10	(36 UI)
LD				

Observations.

L'équilibre de la réaction est en faveur de la réduction du pyruvate. Pour obtenir l'oxydation quantitative du lactate, on déplace l'équilibre vers la droite :

- d'une part, en utilisant des concentrations élevées en NAD et en LD,
- d'autre part, en piégeant les ions pyruvate (par la semicarbazide) et H⁺ (par un milieu alcalin, pH 9,5).

Dans ces conditions, le dosage du lactate est possible avec la LD commerciale (muscle).

Il est toutefois indispensable de suivre la cinétique par enregistrement car :

- la réaction est beaucoup plus lente que celle des précédentes techniques,
- le NADH₂ se réoxyde spontanément et la correction correspondante n'est possible qu'en extrapolant la courbe,
- le maximum, qui correspond à l'oxydation complète du lactate, présente une position variable selon la concentration.

Si nous choisissons de mesurer la différence de densité optique à un moment où l'oxydation du lactate est terminée, le point de la courbe, ainsi retenu, sera diminué d'une valeur (correspondant à la réoxydation du NADH₂) d'autant plus élevée qu'il se situera plus loin du maximum, et que la concentration en lactate sera plus grande.

Pour accélérer la réaction, HOHORST [12] la réalise à 37° et mesure à 25° la différence de densité optique : ce qui oblige à une correction (due à la variation de volume et à la variation de $\Delta \epsilon$ du NADH₂ à 366 nm). Pour éviter ces corrections, nous réalisons la réaction et la mesure à la même température (25° C).

La figure 1 qui représente les cinétiques d'oxydation du lactate à quatre concentrations différentes illustre bien les commentaires précédents. En extrapolant sur l'axe des ordonnées les courbes de réoxydation du NADH₂, on obtient une courbe d'étalonnage où les points sont parfaitement alignés.

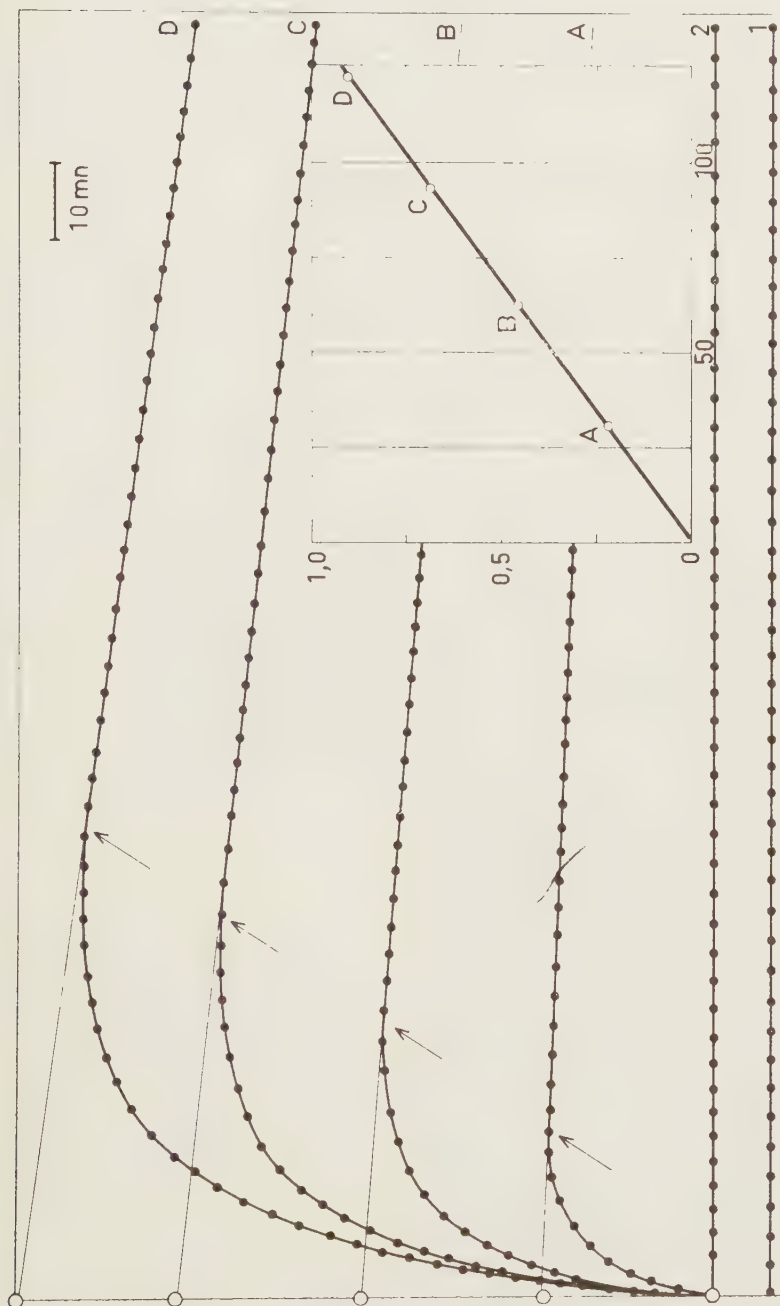


FIG. 1. — Cinétique du dosage de l'acide lactique (à 25°C).
Encadré : les points de la courbe correspondent aux valeurs extrapolées sur
l'axe des ordonnées de la cinétique.

(En abscisses : nmoles - En ordonnées : densité optique).

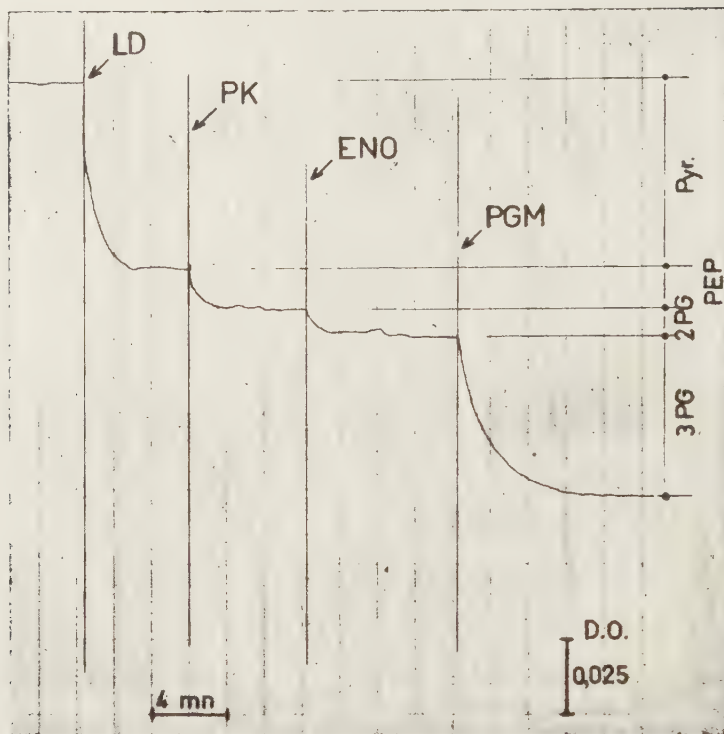


FIG. 2

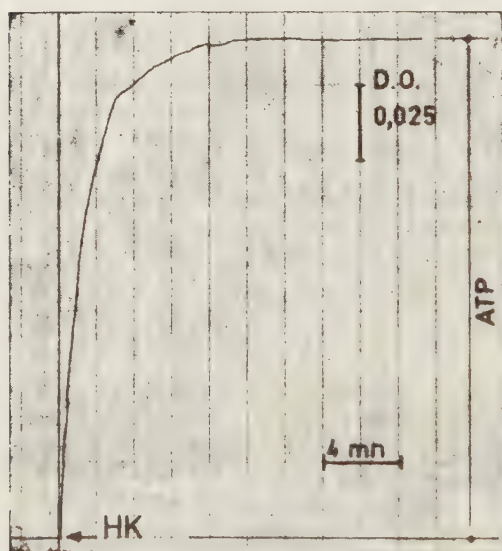


FIG. 2. — Dosage du pyruvate, du phospho-énol-pyruvate, du 2-phospho-glycérate et du 3-phospho-glycérate.

FIG. 3. — Dosage de l'ATP.

FIG. 3

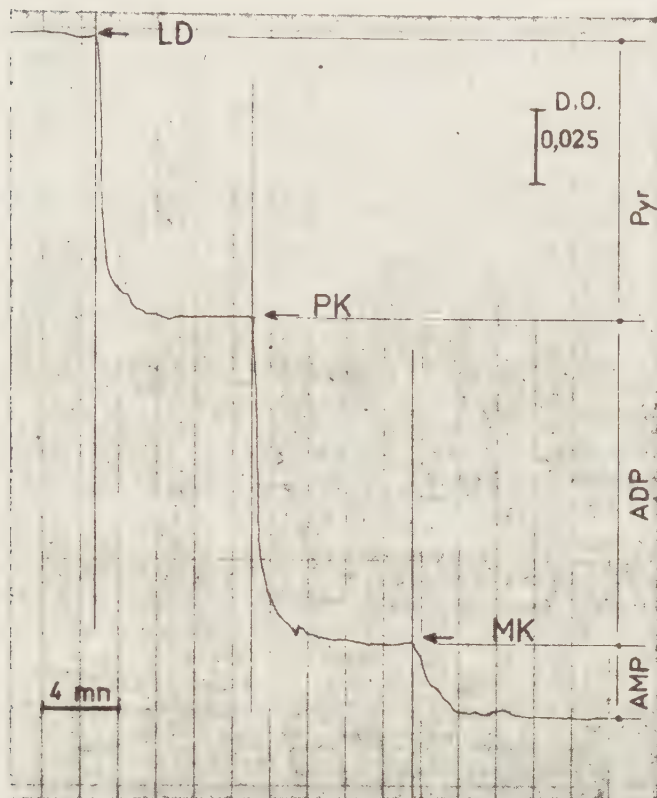


FIG. 4. — Dosage de l'ADP et de l'AMP.

A. — EXTRACTION.

L'extraction peut introduire des erreurs importantes. La stabilité des intermédiaires à doser est très variable et certains particulièrement labiles en milieu acide (1,3-DPG, ATP, ADP, Pyruvate) ou alcalin (PEP, GAP, DHAP) peuvent être détruits lors de l'extraction perchlorique et de la neutralisation. Dans la phase acide, les solutions doivent être maintenues dans la glace. Au cours de la neutralisation, des surconcentrations locales en KOH sont à éviter, et le pH ne doit à aucun moment dépasser 7.

B. — CONSERVATION DE L'EXTRAIT.

La conservation de l'extrait pose également un problème. A l'état congelé, la plupart des constituants acido-solubles sont stables. Mais le pyruvate est sensible

à la congélation, et les triose-phosphates sont assez rapidement détruits dans l'extrait neutralisé. Dans la mesure du possible, il faut donc effectuer les dosages immédiatement. Sinon, il est nécessaire de déterminer au moins ceux qui supportent le moins bien la conservation (DHAP, GAP et Pyr).

C. — TECHNIQUE DE DOSAGE.

La technique de dosage peut être cause de nombreuses erreurs.

1) Les performances du spectrophotomètre : monochromatisme, sensibilité, stabilité, sont évidemment, comme avec les techniques colorimétriques, un important facteur de précision. La qualité du matériel actuel réduit au minimum ces causes d'imprécision. L'emploi d'un appareil utilisant la raie Hg 366 supprime les erreurs de monochromatisme qui passent souvent inaperçues avec les appareils à réseau ou prisme.

La sensibilité et la stabilité de la mesure sont évidemment deux facteurs d'autant plus importants que la concentration à mesurer est plus faible. Et pour certains intermédiaires de la glycolyse, comme le 1,3-DPG ou le GAP dans le globule rouge humain, les concentrations physiologiques se situent à la limite de ce qu'il est possible d'apprécier.

La remarquable stabilité du photomètre Eppendorf est illustrée par la ligne de base de la figure 2 (enregistrement de 120 minutes), et l'étalement de l'échelle d'enregistrement (1 mm correspond à une densité optique de 0,00125) fournit une précision de l'ordre de 1.10^{-9} mole.

2) Les réactifs indiqués dans le tableau I sont généralement d'une pureté satisfaisante. Seul, le NADH₂ pose quelques problèmes. Sa stabilité en solution est discutée. Selon BUCHER et HOHORST [8], sa solution tamponnée par la TEA serait stable à 0 — 4° pendant 2 à 3 semaines. Mais des substances gênant les réactions apparaissent très souvent après quelques jours de conservation et nous ne dépassons pas trois jours de conservation à l'état congelé.

Par ailleurs, son degré de pureté dépasse rarement 90 pour cent : dans les préparations commerciales, la teneur en AMP est généralement élevée. Elle gêne certains dosages et oblige à une purification préalable (cf. Réactifs).

3) La spécificité des enzymes introduits dans la cuve dépend d'une part de la pureté des enzymes, d'autre part du type de la réaction.

Notre longue expérience des enzymes indiqués dans le tableau I nous permet d'affirmer que leur pureté est suffisante pour ne pas fausser les résultats. En particulier, la G-6-PD est pratiquement dépourvue de 6-PGD, dont la présence doublerait la formation de NADPH₂, donc doublerait également la concentration mesurée d'ATP, de G-6-P ou de glucose.

La plupart des enzymes utilisés ont une spécificité de substrat très étroite. Toutefois, certaines réactions sont déclenchées par plusieurs substrats. Tel est le cas pour le dosage du F-1, 6-DP par l'aldolase (technique n° 4) : le sedoheptulose-1,7-diphosphate est également scindé en DHAP qui est dosé. Mais la concentration tissulaire en S-1,7-DP est si faible que cette cause d'erreur n'est pas sensible.

4) La mesure de variation de densité optique dans la cuve provoque les artefacts les plus fréquents. La température de la réaction ne modifie pas la différence de densité optique mesurée en fin de réaction (elle n'intervient que sur la vitesse). HONORST [12] signale que le coefficient d'extinction molaire du NADH_2 à 366 nm varie avec la température. Mais cette variation est si faible (environ 0,8 pour cent par degré) qu'elle peut être négligée.

Il est cependant nécessaire, lorsqu'on introduit un volume important de substrat à doser, d'attendre que le liquide de la cuve ait atteint son équilibre de température.

Dans certains extraits, le plus souvent dans les extraits érythrocytaires, on constate la présence de substances qui provoquent une décroissance de l'absorption du NADH_2 (ou du NADPH_2). Cette activité NADH_2 oxydasique de nature non enzymatique, ne se manifeste habituellement que lorsque la concentration en PCA lors de l'extraction est insuffisante : avec celles que nous indiquons, nous ne l'avons jamais observée. La réoxydation du NADH_2 est également une source d'erreur. C'est une réaction lente qui se fait aux dépens de O_2 (elle est supprimée lorsqu'on travaille sous vide) : elle n'entraîne de correction que dans les dosages du lactate. Elle apparaît nettement sur les courbes de la figure 2 et la correction est obtenue en extrapolant à l'instant zéro la droite d'oxydation du NADH_2 .

L'enregistrement des courbes de densité optique permet de déceler une anomalie possible de la mesure. L'exemple le plus fréquent et qui entraîne des erreurs considérables est l'apparition progressive d'un fin précipité de phosphate ammoniaco-magnésien dont on doit toujours se méfier dans les réactions où l'on introduit un enzyme (en suspension dans une solution de sulfate d'ammonium) et l'ion Mg^{++} comme activateur. De même, de manière plus banale, la présence de fines bulles adhérentes aux parois de la cuve provoquent des variations importantes et brusques de densité optique : il est prudent de toujours s'assurer au début et à la fin de la réaction, de la limpidité du contenu de la cuve.

V. — RÉSULTATS

Pour les raisons techniques de prélèvement et d'extraction que nous avons développées plus haut, le globule rouge humain normal représente le matériel tissulaire le mieux adapté à une illustration des techniques précédentes et à une discussion de la valeur des résultats obtenus. Nous rapportons dans le tableau II les concentrations globulaires des intermédiaires de la glycolyse ; déterminées sur 40 sangs humains normaux, elles sont comparables à celles publiées récemment par MINAKAMI [9, 13].

Nous avons calculé les constantes d'équilibre de trois réactions simples (tableau III), ce qui fournit un autre contrôle de la validité des résultats : les valeurs calculées à partir des concentrations du tableau II sont voisines de celles de MINAKAMI (globule rouge) et des valeurs des constantes relevées par HESS [14].

Nous avons enfin comparé les concentrations directement mesurées par les techniques enzymatiques et exprimées en μg de phosphore au dosage du phosphore total de l'extrait acido-soluble. Pour obtenir une variation importante de répar-

TABLEAU II

Concentration des intermédiaires de la glycolyse
dans le globule rouge humain normal

(40 échantillons)	EN NMOLES/ML GR		
	MOYENNE =	$\pm \sigma$	MINAKAMI
I — G-1-P	0	—	0
G-6-P	31,3	6,8	27
F-6-P	9,7	1,8	11
F-1,6-DP	3,8	1,5	5
Trioses P (*)	19,2	4,9	16
3-PG	66,3	7,4	48
2-PG	11,8	2,5	7
PEP	17,4	3,8	12
II — Pyr	0	—	71 (***)
Lact	660	—	1190 (***)
III — ATP	1527	180	1128
ADP	170	21	126
AMP (**)	20	—	50
IV — G-1,6-DP	97,4	17,0	—
2,3-DPG	4582	610	4000

(*) Le rapport DHAP/GAP étant de 7,5 environ (donc GAP à la limite de sensibilité du dosage), nous avons déterminé la somme des 2 trioses phosphates.

(**) Les valeurs indiquées concernent un nombre plus limité d'échantillons qui ne correspondent pas à ceux de la série. Les concentrations en AMP, déterminées avec des lots de NADH₂ non purifiés par hydrolyse phosphatase, étaient plus élevées et du même ordre de grandeur que celles antérieurement publiées.

(***) Les concentrations de MINAKAMI concernent le sang total, les nôtres ont été déterminées sur le globule rouge.

TABLEAU III

Constantes d'équilibre (PHM, PGM, Eno)

	GLOBULES ROUGES		HESS
	CARTIER	MINAKAMI	
F-6-P/G-6-P	0,31	0,17 (13) 0,40 (9)	0,47
2-PG/3-PG	0,18	0,24 (13) 0,15 (9)	0,43
PEP/2-PG	1,5	0,8 (13) 1,7 (9)	4

tition des diverses fractions phosphorées, nous avons utilisé des sangs de la banque du sang à divers stades de conservation (*). Le tableau IV montre que la somme des 13 phosphodérivés dosés par voie enzymatique fournit un bilan satisfaisant avec le phosphore total dosé après minéralisation par la technique de Fiske et Subbarow.

TABLEAU IV

Bilan phosphoré du globule rouge prélevé sur ACD et conservé à $+ 3^{\circ}\text{C}$

	CONSERVATION A $+ 3^{\circ}\text{C}$			
	0	1 JOUR	5 JOURS	12 JOURS
1 — P organique total (*)	358,5	371	235	147
2 — P PO_4 GR	15,9	38,9	165	225
3 — P PO_4 Plasma	43,7	32	36	70
P total sang calculé (**)	203,9	205	205	206
P total mesuré	208	209	213	208

(*) Somme des fractions I, III et IV définies au tableau II.

(**) Le calcul du P total aux dépens des résultats des lignes 1, 2 et 3 tient compte de la mesure de l'hématocrite.

Ce tableau appelle quelques commentaires :

— la plupart des valeurs les plus récentes de MINAKAMI sont de 20 à 25 pour cent inférieures aux nôtres. Cette différence s'explique certainement par leur technique de défécation : l'extraction réalisée avec 2 volumes de PCA 0,6 N est sans doute incomplète.

— Les valeurs de la concentration en AMP dans les conditions que nous précisons sont très nettement inférieures à celles que l'on relève dans la littérature et à celles que nous avons nous-mêmes obtenues par séparation chromatographique. Ces valeurs basses s'expliquent d'une part, par les conditions d'extraction à basse température (qui réduisent la déphosphorylation des adénosine-polyphosphates) et par l'utilisation d'un NADH_2 sans AMP contaminant.

— Le 2,3-DPG et le G-1,6-DP qui figurent dans le tableau sont deux disphosphodérivés que l'on trouve à une concentration élevée dans le globule rouge. Les concentrations indiquées ont été déterminées par deux techniques enzymatiques qui seront exposées séparément.

— Les rares valeurs de pyruvate et de lactate relevées dans la littérature sont certainement erronées. Les conditions de prélèvement modifient considérablement la répartition de ces deux anions entre plasma et globules. Les concentrations en

(*) Au cours de la conservation, les fractions organiques subissent d'importantes variations et les orthophosphates s'accumulent.

lactate du sang total sont analogues à celles de MINAKAMI. Lorsque le sang est immédiatement recueilli à basse température, la concentration intraglobulaire, calculée à partir des valeurs du sang total (1,126 nmoles/ml), du plasma (925 nmoles/ml) et de l'hématocrite, est de 660 nmoles/ml.

La même technique fournit pour le pyruvate une concentration pratiquement nulle. Notre expérience du dosage de ces deux anions dans le globule rouge et dans les tissus confirme d'ailleurs les conclusions de DALE : il est très difficile de réaliser les conditions optimales de fixation et d'extraction.

[Laboratoire de Biochimie Médicale (Pr P. CARTIER),
Hôpital des Enfants-Malades, 149, rue de Sévres,
75-Paris (15°)].

Résumé

La détermination de la concentration des intermédiaires de la glycolyse dans les tissus pose le double problème de leur extraction quantitative (complicquée par l'instabilité de certains phosphodérivés) et de leur microdosage à des concentrations très inférieures à la micromole.

Dans le présent travail, les conditions de prélèvement des tissus, de leur extraction, sont discutées. Le microdosage est réalisé par des méthodes enzymatiques très standardisées qui remplissent des conditions de sensibilité (10^{-9} moles), de spécificité et de simplicité impossibles avec les méthodes photométriques classiques.

Les techniques proposées permettent (avec un minimum de réactifs et de manipulations) de doser sur un même échantillon tissulaire quinze composés associés à l'activité glycolytique.

Techniques for the estimation intermediaries of glycolysis in the tissues

By P. CARTIER, J.-P. LEROUX and H. TEMKINE

Summary

The determination of the concentration of the intermediary compounds of glycolysis in the tissues poses the double problem of their quantitative extraction (complicated by the instability of certain phosphoderivatives) and of their microestimation in concentrations much smaller than a micromole.

In the present work, the conditions for obtaining the tissues and their extraction are discussed. The microestimation is carried out by enzymatic methods which are very standardized which give conditions of sensitivity (10^{-9} mole), specificity and simplicity which cannot be obtained by classical photometric methods.

The proposed techniques allow (with a minimum of reagents and manipulations) the estimation of fifteen compounds associated with glycolytic activity in the same sample of tissue.

Bibliographie

1. CARTIER P., LEROUX J.-P. et MARCHAND J.-C. — *Ann. Biol. clin.*, 1967, 25, 109.
 2. CARTIER P. et LEROUX J.-P. — 8^e Journées Biochimiques Latines, Lisbonne, 1965. Rapports et communications scientifiques, T. 135, 84.
 3. DALE R. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1965, 181, 701.
 4. DALE R. — *Biochem. J.*, 1965, 96, 347.
 5. CARTIER P. et LEROUX J.-P. — *Rev. franç. Etud. clin. biol.*, 1966, 11, 835.
 6. HOHORST H., KREUTZ F., BUCHER Th. — *Biochem. Z.*, 1959, 332, 18.
 7. YOUNG D. — *Biochim. biophys. Acta (Amst.)*, 1964, 90, 178.
 8. BUCHER Th., HOHORST H. — In : *Methods of enzymic analysis*, by BERGMAYER, p. 246. Berlin, Springer Verlag, 1963.
 9. MINAKAMI S., SUZUKI C., SAITO T., YOSHIKAWA H. — *J. Biochem. (Tokyo)*, 1965, 58, 543.
 10. MAITRA P., ESTABROOK R. — *Analyt. Biochem.*, 1964, 7, 172.
 11. WILLIAMSON J. — *J. biol. Chem.*, 1966, 241, 5026.
 12. HOHORST H. — *Biochem. Z.*, 1957, 328, 509.
 13. MINAKAMI S., SAITO T., SUZUKI C., YOSHIKAWA H. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1964, 17, 748.
 14. HESS B. — *Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle*. Berlin, Springer Verlag, 1963.
-

LE 2,3-DIPHOSPHOGLYCÉRATE ET LE GLUCOSE-1,6-DIPHOSPHATE DU GLOBULE ROUGE : TECHNIQUES DE DOSAGE

Par P. CARTIER et H. TEMKINE

Les phosphodérivés de la fraction acido-soluble du globule rouge reflètent l'activité énergétique de la cellule, c'est-à-dire essentiellement son activité glycolytique. Toutefois, la répartition de ces phosphodérivés est très différente de celle des autres tissus : elle est caractérisée par une concentration élevée et une grande variété de composés diphosphorylés, issus à la fois de la voie d'Embden Meyerhof et du shunt oxydatif direct des hexoses monophosphates.

Trois diphosphates ont été signalés à des concentrations faibles, mais toutefois décelables par séparation chromatographique : ce sont le ribose-1,5-diphosphate [1], le sédoheptulose-1,7-diphosphate [2] et l'octulose-1,8-diphosphate [3]. Leur formation est associée à l'activité du shunt (qui représente environ 10 pour cent de la glycolyse totale), mais leur signification biochimique dans le globule rouge n'est pas encore clairement établie.

Deux diphosphodérivés qui n'existent qu'à l'état de traces dans les autres tissus s'accumulent à concentration élevée dans le globule rouge (tableau I). Ce sont :

— d'une part, le 2,3-diphosphoglycérate (2,3-DPG), identifié en 1925 par GREENWALD [4] et qui représente normalement plus de 70 pour cent des phosphodérivés de la fraction acido-soluble (*).

TABLEAU I
Concentrations en 2,3-diphosphoglycérate et en glucose-1,6-diphosphate
du globule rouge humain normal (exprimées en nmoles par ml).

AUTEURS	2,3-DPG	G-1,6-DP
TOWNE [9]	5 200 à 5 400	—
MILLS [10]	4 010 à 4 640	—
VANDERHEIDEN [5]	3 600 à 5 000	180 à 300
BARTLETT [6]	3 600 à 5 010	190 à 235
MINAKAMI [11]	4 800	—
MINAKAMI [12]	4 000	—
CARTIER et TEMKINE (30 échantillons)	4 770 ± 550	97 ± 16

(*) HASHIMOTO [7, 8] a montré que dans le globule rouge, une fraction faible du 2,3-DPG est sous forme combinée avec l'AMP : l'adénylate-2,3-DPG, que nous retrouvons effectivement dans les séparations sur Dowex 1 de la fraction acido-soluble.

— D'autre part, le glucose-1,6-diphosphate (G-1,6-DP) mis en évidence par VANDERHEIDEN et coll. [5] et BARTLETT [6].

Dans les autres cellules, ces deux diphosphates interviennent à l'état de traces comme co-enzymes de deux réactions phosphomutasiques : le G-1,6-DP dans la transformation du glucose-1-phosphate en glucose-6-phosphate (phosphohexomutase, PHM), le 2,3-DPG dans la transformation du 3-phosphoglycérate en 2-phosphoglycérate (phosphoglycératemutase, PGM).

L'origine et le rôle du 2,3-DPG sont actuellement assez bien définis. Il se forme dans une dérivation de la voie glycolytique d'Embden Meyerhof : le cycle dit de « Rapoport-Luebering », et l'étude de l'incorporation du $^{32}\text{PO}_4$ montre que son turnover n'est pas négligeable [13]. Cet ester constitue une réserve énergétique, un véritable « phosphagène stable » du globule rouge utilisable lorsque la dégradation du glucose est inhibée : par exemple, dans le sang conservé, la formation de lactate se fait initialement aux dépens du 2,3-DPG, qui disparaît complètement dans les deux premières semaines à + 4° C. Comme la transformation du 2,3-DPG $\longrightarrow$ lactate recharge 1 ATP sans en consommer, cette utilisation du 2,3-DPG freine l'épuisement de l'ATP.

Nous étudions actuellement le mécanisme de formation du G-1,6-DP et sa signification biochimique dans le globule rouge. Nous avons montré qu'il se forme aux dépens du glucose-1-phosphate par une transphosphorylation aux dépens de l'acide 1,3-diphosphoglycérique selon la réaction :



mais son rôle métabolique est encore obscur. Sa concentration est remarquablement constante dans les conditions où le 2,3-DPG, au contraire, disparaît rapidement. Son accumulation dans le globule rouge semble peu en rapport avec son rôle de coenzyme de la phosphohexomutase. Ce qui d'ailleurs supposerait une importante glycogénolyse : or, bien que le globule rouge possède certains des enzymes associés au métabolisme du glycogène, phosphorylase, amylo-1,6-glucosidase, phosphohexomutase), la glycogénolyse n'a jusqu'ici pu être démontrée (absence de glycogène (*)) et de glucose-1-phosphate intraglobulaire).

LE DOSAGE DU 2,3-DPG ET DU G-1,6-DP

Le dosage du bloc des esters phosphoriques obtenu après passage sur charbon de la fraction acido-soluble, qui élimine les phosphonucléotides, fournit une approximation des concentrations en 2,3-DPG (puisque ce composé représente 94 pour cent du P ainsi dosé) qui peut être dans certains cas suffisantes [15] mais qui perd toute signification lorsque le 2,3-DPG est métabolisé et subit des variations importantes.

Les déterminations supposent une extraction quantitative des deux phosphodérivés. C'est là un problème complexe que nous avons précédemment discuté [16].

(*) OCKERMAN en signale de très faibles concentrations dans les séparations sur DEAE Séphadex [14].

L'extraction perchlorique dans les conditions que nous avons proposées fournit des résultats reproductibles et comme le montre la comparaison du bilan phosphoré et du dosage du P total, extrait quantitativement les esters phosphoriques. Les précautions au cours de l'extraction doivent être respectées pour le dosage du G-1,6-DP (qui risque d'être déphosphorylé en G-6-P en milieu acide), au contraire, le 2,3-DPG est remarquablement stable, quel que soit le pH de la solution.

Une méthode de dosage très spécifique de ces deux diphosphates a été proposée qui découle directement de leur rôle coenzymatique et consiste à mesurer l'effet du 2,3-DPG sur la transformation $3\text{-PG} \rightleftharpoons 2\text{-PG}$ [9] et celle du G-1,6-DP sur la transformation $\text{G-1-P} \rightleftharpoons \text{G-6-P}$ [17].

De par leur principe même, ces méthodes sont très sensibles et permettent de déterminer des concentrations très faibles (ce qui n'est précisément pas le cas pour le globule rouge) mais avec une précision très relative. Par ailleurs, ces méthodes présentent des difficultés techniques, en particulier, l'emploi de mutases déphosphorylées et de glucose-1-phosphate dépourvu de G-1,6-DP qui nous y ont fait renoncer.

Étant donné l'intérêt très particulier de ces deux diphosphates dans le métabolisme glucidique du globule rouge normal et pathologique, et la place importante qu'ils tiennent dans le bilan phosphoré intracellulaire, nous avons jugé utile de préciser les deux techniques que nous avons mises au point. Techniques enzymatiques qui permettent, en appliquant des méthodes que nous avons précédemment décrites, de compléter le bilan des phosphodérivés de la glycolyse.

I. — Préparation de l'extrait globulaire.

La défécation doit extraire quantitativement les deux diphosphates acidosolubles, et être réalisée dans des conditions qui évitent une hydrolyse spontanée du G-1,6-DP en G-6-P (le 2,3-DPG étant très stable).

Le problème est différent selon que l'on désire doser uniquement le 2,3-DPG seul, ou le 2,3-DPG et le G-1,6-DP. Dans le premier cas, une défécation de 1 volume de globules par 9 volumes d'acide perchlorique (PCA) 1.2 N est satisfaisante (défécation au 1/10). Lorsqu'on désire doser les deux diphosphates, la concentration faible en G-1,6-DP impose une défécation différente (qui permet également de doser les autres intermédiaires de la glycolyse : cette technique (défécation au 1/3 environ) a été précédemment décrite [16] : elle permet le dosage du 2,3-DPG et du G-1,6-DP sur un échantillon de 5 ml de sang total ou de 2 ml de globules rouges lavés).

II. — Dosage du 2,3-DPG.

A. — DOSAGE COLORIMÉTRIQUE.

BARTLETT a proposé une méthode colorimétrique : chauffé en milieu sulfurique en présence d'acide chromotrope, le 2,3-DPG développe une coloration bleu vert (max = 695 nm) [15]. Mais cette méthode, en apparence très séduisante, n'est pas directement applicable à l'extrait acido-soluble : elle nécessite une séparation pré-

alable du 2,3-DPG, soit par chromatographie sur Dowex 1, soit par précipitation barytique.

Nous avons pendant longtemps employé ces deux techniques laborieuses de séparation. Par sa relative simplicité et la constance des résultats obtenus, nous préférons la précipitation barytique et nous indiquons rapidement cette méthode (qui nous a servi de comparaison à la technique enzymatique). Cette technique est applicable tant que la concentration globulaire du 2,3-DPG (normalement de 4 à 5 mM) ne s'abaisse pas au-dessous de 1 mM : au-dessous, la méthode de BARILETTI n'est plus suffisamment sensible.

Technique.

Une prise d'essai de 200 à 400 nmoles (*) (ce qui correspond à environ 0,8 ml d'un extrait perchlorique neutralisé de globule rouge au 1/10) est précipitée par 0,1 ml d'une solution de chlorure de baryum à 10 %. Après 30 minutes à 0°, le précipité est centrifugé, lavé avec 0,5 ml de Cl_2Ba à 0,5 %. Le culot est dissous dans quelques gouttes d'acide chlorhydrique 2 N, et le baryum est éliminé par du sulfate de sodium à 10 %. Après 30 minutes, l'extrait est centrifugé, le surnageant est filtré et le culot rincé avec 2 ml d'eau bidistillée. L'extrait est lyophilisé dans les tubes à essai Quickfitt MF 24/2, puis repris par exactement 0,2 ml d'eau.

On prépare simultanément une courbe d'étalonnage, avec des concentrations comprises (dans une prise d'essai de 0,2 ml) entre 0 et 0,50 μ moles de 2,3-DPG (préparé à partir de 2,3-DPG pentacyclohexylammonium Bœhringer) dont la pureté est contrôlée par le dosage du P total et du P acido-labile).

Dans tous les tubes, on ajoute lentement 5,8 ml d'une solution à 0,010 % d'acide chromatopique recristallisé [18], dans l'acide sulfurique concentré Merck. Les tubes sont chauffés au bain-marie bouillant pendant deux heures et la coloration est lue au photomètre à 695 nm.

B. — DOSAGE PAR HYDROLYSE PHOSPHATASIQUE DU 2,3-DPG.

Le dosage enzymatique consiste à hydrolyser le 2,3-DPG par une phosphatase spécifique (ZANCAN, RECONDO et LELOIR [19]) en 3-PG et à transformer le 3-PG en pyruvate (par l'addition de PGM, de ENO et de PK) qui est dosé spectrophotométriquement par la méthode que nous avons décrite [16].

1) Technique.

— Préparation de la 2,3-DPG phosphatase :

Les muscles de pattes postérieures d'un lapin (anesthésié lentement au sulfate de magnésium, selon UMBREIT et coll. [20]) sont prélevés, découpés aux ciseaux et broyés au Turmix dans deux volumes d'eau distillée refroidie dans la glace. L'extrait est filtré sur gaze et se conserve congelé à -20° pendant plus de trois mois. L'enzyme est partiellement purifié : 30 ml d'extrait sont précipités à -20° par 30 ml de méthanol. Après centrifugation à 10 000 g pendant 15 minutes, le culot est éliminé et le surnageant à nouveau précipité par 30 ml de méthanol, et centri-

(*) 1 nmole (nanomole) = 1.10^{-9} mole (ou 1 millimicromole).

fugé à 10 000 g. Le culot repris par 2 ml d'eau froide est dialysé pendant 30 minutes contre du mercaptoéthanol 1 mM. Après centrifugation d'un insoluble, le surnageant est concentré par dialyse contre du glycérol pur pendant 1 heure. L'enzyme ainsi préparé est stable pendant une semaine à + 4°.

2) Réactifs.

— Tampon (5 mM pour chaque composant) :

TRIS	60,5 mg
Pyrophosphate Na	223 mg
Cl ₂ Mg	101,5 mg
ClK	37,2 mg
Eau bidistillée q.s.p.	100 ml

Ajuster à pH 7,40 avec HCl.

— ADPNa ₃ (Pabst) 52,5 mM	25,89 mg/ml
— Pyruvate-kinase Boehringer	1 250 U.I./ml
— Enolase Boehringer	270 U.I./ml
— Phosphoglycératemutase Boehringer	180 U.I./ml

3) Dosage.

Dans un microtube à centrifuger, prélever :

	VOLUME FINAL 500 μ l	CONCENTRATION FINALE
Extrait perchlorique	200 μ l	
Réactif TRIS 5 mM	200	2 mM
ADP 52,5 mM	20	2,1 mM
2,3-diphosphatase	50	
Pyruvate-kinase	10	(12,5 U.I.)
Enolase	10	(2,7 U.I.)
Phospho-glycérate mutase	10	(1,8 U.I.)

Après deux heures d'incubation à 37°, les protéines sont coagulées (chauffage pendant 2 minutes à 95°). Le surnageant est centrifugé et transvasé dans des tubes jaugés à 2 ml. Le culot est lavé 3 fois par 0,5 ml d'eau et les surnageants sont complétés à 2 ml. Le pyruvate formé est dosé par lacticodéshydrogénase [16] sur 1 à 1,5 ml (fig 1).

Le pyruvate dosé après incubation représente la somme du 2,3-DPG, du 3-PG, du phosphoénolpyruvate et du pyruvate préexistant dans l'extrait perchlorique. Ces quatre derniers composés dosés par ailleurs par spectrophotométrie directe sur l'extrait perchlorique (*) sont soustraits du chiffre du pyruvate obtenu : comme leur

(*) La figure 2 précédemment publiée [16] représente le dosage séparé des 4 constituants du bloc (3-PG $\rightarrow$ pyruvate) : elle correspond à un volume d'extrait PCA 10 fois supérieur à celui utilisé dans le dosage du 2,3-DPG. Dans la correction introduite ici, on détermine en un seul temps le bloc des quatre constituants (les enzymes étant ajoutés simultanément).

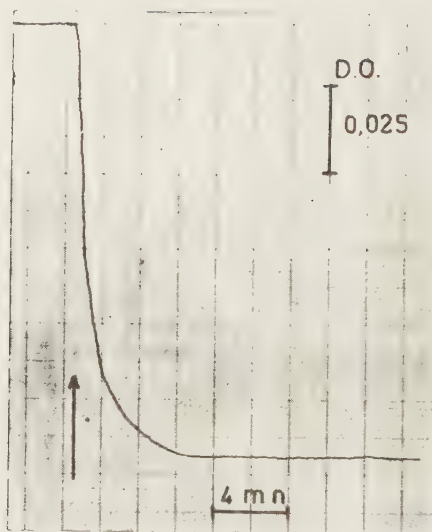


FIG. 1

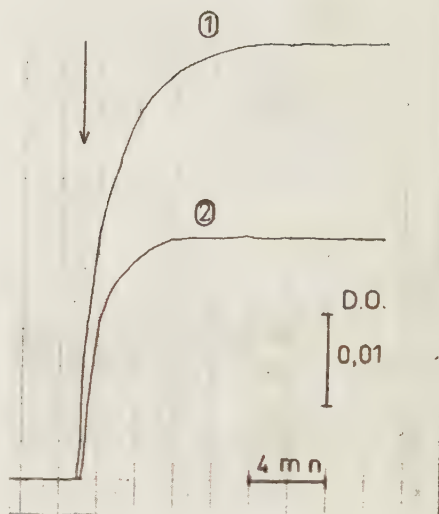


FIG. 2

FIG. 1. — Dosage du 2,3-diphosphoglycérate.

(Incubation sur 200 μ l extrait PCA. Dosage sur 1 ml de surnageant d'incubation à 366 nm [$\epsilon_{\text{NADH}_2} = 3,3 \cdot 10^5 \text{ cm}^2/\text{mole}$]).

$$\Delta \text{DO} = 0,1425$$

$$142,5 \times \frac{3,05}{3,3} \times \frac{2 \times 25}{0,2 \times 8} = 4\,115 \text{ nmoles/ml GR}$$

Le bloc (3-PG $\rightarrow$ pyruvate) est déterminé directement sur l'extrait PCA = 152 nmoles (soit une correction de 3,7 %).

Teneur en 2-3-DPG = 4 115 — 152 = 3 963 nmoles/ml GR.

FIG. 2. — Dosage du glucose 1,6-diphosphate (et du glucose-6-phosphate).

(Mesures à 366 nm — $\epsilon_{\text{NADH}_2} = 3,3 \cdot 10^5 \text{ cm}^2/\text{mole}$).

1) (G-1,6-DP + G-6-P)

sur 2,5 ml d'hydrolysats final

$$\Delta \text{DO} = 0,0479$$

$$47,9 \times \frac{2,95}{3,3} \times \frac{2,5 \times 25}{2,5 \times 8} = 133,8 \text{ nmoles}$$

2) (G-6-P)

sur 2,5 ml d'extrait PCA initial

$$\Delta \text{DO} = 0,0267$$

$$26,7 \times \frac{2,95}{3,3} \times \frac{25}{2,5 \times 8} = 29,9 \text{ nmoles}$$

d'où G-1,6-DP = 133,8 — 29,9 = 103,9 nmoles/ml GR.

somme représente moins de 5 pour cent de la concentration du 2,3-DPG, la correction est faible.

III. — Dosage du G-1,6-DP.

Le principe du dosage G-1,6-DP que nous avons adopté est analogue à celui du 2,3-DPG : le diphosphoglucose est déphosphorylé en glucose-6-phosphate qui est déterminé enzymatiquement par la glucose-6-phosphate déshydrogénase en présence de NADP. La différence réside dans la déphosphorylation qui est ici plus simple : le G-1,6-DP est très rapidement hydrolysé par chauffage en milieu acide en G-6-P (*).

Technique.

2 ml d'extrait perchlorique neutralisé sont hydrolysés au bain-marie pendant 15 minutes avec 1 ml d'acide chlorhydrique N.

L'hydrolysate est neutralisé avec 1 ml de NaOH N et complété à 5 ml. Le dosage du G-6-P apparu se fait selon la technique décrite [16, fig. 3], par spectrophotométrie à 340 ou à 366 nm dans une cuve contenant :

Tampon TEA (0,5 M)	EDTA 0,05 M pH 7,4	0,300 ml
	NADP 15 mM	0,100 ml
	Extrait hydrolysé	2,5 ml

La réaction est déclenchée par l'addition de 10 μ litres de glucose-6-phosphate déshydrogénase Boehringer. La dénivelation de densité optique est convertie en μ moles de glucose-6-phosphate. Cette valeur est corrigée de celle du glucose-6-phosphate préexistant dans l'extrait perchlorique initial (qui représente environ 1/3 du glucose-1,6-diphosphate (fig. 2)).

DISCUSSION DES TECHNIQUES

I. — 2,3-diphosphoglycérate.

La sensibilité et la précision de la méthode enzymatique sont celles qui ont été précédemment discutées [16]. Dans le cas du globule rouge, la forte concentration en 2,3-DPG ne limite pas la sensibilité et permet de choisir une concentration ou elle est la plus favorable. Ainsi, avec des globules rouges humains normaux défectueux au 1/3 environ, le dosage final du pyruvate sur 1,5 ml du surnageant d'incubation (qui correspond à 30 μ l de globules rouges) fournit sur l'enregistrement (dans les conditions techniques que nous avons décrites) une dénivelation des deux plateaux de 120 mm environ.

Dans le tableau II, les deux méthodes ont été comparées : le pourcentage de récupération de quantités croissantes de 2,3-DPG ajoutées est voisin de 100. Toutefois, la méthode colorimétrique n'est satisfaisante que pour des concentrations

(*) Les constantes d'hydrolyse du P en 1 du G-1-P et du G-1,6-DP sont analogues : en milieu HCl N à 100°, l'hydrolyse est complète en 7 minutes [21].

TABLEAU II

Dosage du 2,3-diphosphoglycérate.
(Récupération du 2,3-DPG ajouté,
et comparaison du dosage colorimétrique et enzymatique).

	COLORIMÉTRIQUE			ENZYMATIQUE		
	CALCULÉ	TROUVÉ	% THÉORIQUE	CALCULÉ	TROUVÉ	% THÉORIQUE
GR (par ml)		4 320			4 380	
id + 520 2,3-DPG	4 840	4 800	99,2	4 900	4 920	100,4
1 040 »	5 360	5 360	100	5 420	5 400	99,6
2 080 »	6 400	6 360	99,4	6 460	6 510	100,8
			99,5			100,3
GR ACD						
Conservé à + 4°						
1 jour		3 590			3 700	
2		2 760			2 810	
4		2 245			2 165	
7		320 (?)			670	
11		Indo- sable			230	

TABLEAU III

Dosage du glucose-1,6-diphosphate.
(Récupération des quantités ajoutées et influence du G-6-P).

G-1,6-DP	G-6-P	DOSAGE			
		G-1,6-DP		G-6-P	
		THÉORIQUE	RETROUVÉ %	RETROUVÉ %	RETROUVÉ %
76	0	77,5	102,0	0	
76	56,2	75,7	98,5	56,5	100,5
76	168,6	76,7	100,4	166,3	98,6
			100,3		99,5
152	0	154	101,1	0	
152	56,2	154	101,1	56,4	100,4
152	112,4	153	100,8	111,2	98,9
152	168,6	162	106,4	167,4	99,3
			102,3		99,5

élevées ; la méthode devient imprécise aux faibles concentrations, car la coloration finale est légèrement différente.

II. — Glucose-1,6-diphosphate.

Le tableau III traduit l'influence de concentrations croissantes en G-6-P sur le dosage du G-1,6-DP : alors que dans les conditions physiologiques, le rapport $\frac{\text{G-6-P}}{\text{G-1, 6-DP}}$ est d'environ 0,3 $\frac{(30 \text{ M})}{(100 \text{ M})}$, des concentrations élevées en G-6-P (rapport supérieur à 2) ne modifient pas la précision de la méthode proposée : les rendements de récupération du G-1,6-DP ajoutés sont proches de 100 pour cent.

(Laboratoire de Biochimie Médicale, Hôpital des Enfants-Malades, 149, rue de Sèvres, 75-Paris-15^e).

Résumé

Le 2,3-diphosphoglycérate et le glucose-1,6-diphosphate sont deux intermédiaires de la voie glycolytique d'Embden-Meyerhof qui s'accumulent dans le globule rouge humain à une concentration élevée, alors qu'on ne les décèle dans les autres tissus qu'à l'état de traces.

Leur rôle biochimique très particulier justifie l'intérêt de leur détermination. Nous proposons deux techniques enzymatiques, permettant de doser spécifiquement avec une précision élevée, soit le 2,3-diphosphoglycérate sur un échantillon de globules rouges inférieur à 100 μl , soit le 2,3-diphosphoglycérate et le glucose-1,6-diphosphate sur 2 ml de globules rouges.

The 2,3-diphosphoglycerate and glucose-1,6-diphosphate of the red blood cells : techniques of estimation

By P. CARTIER and H. TEMKINE

Summary

The 2,3-diphosphoglycerate and glucose-1,6-diphosphate are two intermediaries in the glycolytic route of Embden-Meyerhof which accumulate in the human red blood cells in high concentration, while they are only found in traces in other tissues.

Their very specific biochemical role justifies the importance of their determination. We propose two enzymatic techniques, allowing the specific estimation with great accuracy, either 2,3-diphosphoglycerate in a sample of blood less than 100 μl , 2,3-diphosphoglycerate and glucose-1,6-diphosphate in 2 ml of red blood cells.

Bibliographie

1. VANDERHEIDEN B.S. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1961, 6, 117.
2. BUCOLO G., BARTLETT G.R. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1960, 3, 620.
3. BARTLETT G.R., BUCOLO G. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1960, 3, 474.
4. GREENWALD I. — *J. biol. Chem.*, 1925, 63, 339.
5. VANDERHEIDEN B.S., HUENNEKENS F.M., GABRIO B.W. — *Fed. Proc.*, 1958, 17, 327.
6. BARTLETT G.R. — *J. biol. Chem.*, 1959, 234, 449.
7. HASHIMOTO T., ISHII Y., TATIBANA M., YOSHIKAWA H. — *J. Biochem. (Tokyo)*, 1961, 50, 471.
8. HASHIMOTO T., YOSHIKAWA H. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1961, 5, 71.
9. TOWNE J.C., RODWELL V.W., GRISOLIA S. — *J. biol. Chem.*, 1957, 226, 777.
10. MILLS G., SUMMERS L. — *Arch. Biochem.*, 1959, 84, 7.
11. MINAKAMI S., SAITO T., SUZUKI C., YOSHIKAWA H. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1964, 17, 748.
12. MINAKAMI S., SUZUKI C., TAKAYASU S., YOSHIKAWA H. — *J. Biochem. (Tokyo)*, 1965, 58, 543.
13. CHEDRU J., CARTIER P. — *Biochim. biophys. Acta*, 1966, 125, 500.
14. OCKERMAN P.A. — *Biochim. biophys. Acta*, 1963, 74, 588.
15. CARTIER P., CHEDRU J., BAUDEQUIN P. — *Bull. Soc. Chim. biol. (Paris)*, 1959, 41, 525.
16. CARTIER P., LEROUX J.P., TEMKINE H. — *Ann. Biol. clin.*, 1967, 25, 791-813.
17. CARDINI C.E., PALADINI A.C., CAPUTTO R., LELOIR L.F., TRUCCO R.E. — *Arch. Biochem.*, 1949, 22, 87.
18. BARTLETT G.R. — *J. biol. Chem.*, 1959, 234, 459.
19. ZANCAN G.T., RECONDO E.F., LELOIR L.F. — *Biochem. biophys. Acta*, 1964, 92, 125.
20. UMBREIT W.W., BURRIS R.H., STAUFFER J.F. — *Manometric Techniques*, p. 291. Minneapolis (Min.), Burgess Publishing Co, 1959.
21. COLOWICK S.P., KAPLAN N.O. — *Methods in Enzymology*, Tome III, p. 143. New York, Academic Press, 1957.

BIOCHIMIE. — *Mécanisme de synthèse du glucose-1,6-diphosphate dans le globule rouge humain*. Note (*) de M^{me} **Hélène Temkine**, présentée par M. Georges Champetier.

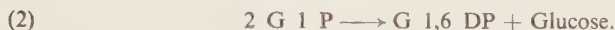
Le glucose-1,6-diphosphate est synthétisé dans le globule rouge par une voie différente de celles qui sont proposées classiquement. En effet, la purification de plus en plus poussée de l'enzyme responsable de cette synthèse nous a prouvé que le glucose-1-phosphate était phosphorylé non par l'ATP mais par le 1,3 DPG. Cette conclusion rejoint les travaux d'Alpers qui a montré récemment que la phosphohexomutase de muscle pouvait former du glucose-1,6-diphosphate à partir de glucose-1-phosphate et de 1,3-diphosphoglycerate.

Deux voies de formation du glucose-1,6-diphosphate ont été proposées (1, 2) :

— une voie kinasique :



— une voie transphosphorylasique :



Le G 1,6 DP se trouve en concentration élevée dans le globule rouge humain (environ 0,1 mM) : le mécanisme de sa formation est différent de ceux décrits précédemment par Leloir et coll.

I. MÉTHODES. — a. *Préparation de l'enzyme*. — Les globules rouges fraîchement prélevés sur héparine ou conservés en ACD moins de 10 jours, sont centrifugés, débarrassés du plasma et des leucocytes et après deux lavages en NaCl 0,154 M, hémolysés par congélation et décongélation. L'hémoglobine est éliminée par la technique d'Hennessey et coll. (³). L'hémolysat dilué au demi est agité avec un égal volume de suspension de DEAE-cellulose à 8 % dans un tampon PO₄ 1/300 M pH 7,0. Après plusieurs lavages dans ce tampon, la fraction enzymatique est éluée par une solution de NaCl 0,5 M.

L'enzyme est d'abord purifiée par adsorption sur une colonne de DEAE-cellulose et éluée par un gradient de NaCl : la fraction active passe à la concentration NaCl 0,04 M (⁴). Cette fraction est finalement isolée par précipitation en Sulfate d'ammonium entre 40 et 60 % de saturation.

b. *Mesure de l'activité enzymatique*. — Le milieu (Tris pH 7,4, 30 mM ; Mg ++, 10 mM ; G 1 P, 6 mM ; ATP, 5 mM) est additionné de l'enzyme en volume variable selon l'activité de la préparation (volume final 5 ml). Après 60 à 180 mn d'incubation à 37°, on arrête la réaction par une défécation perchlorique. Sur l'extrait neutralisé, le G 1,6 DP, est dosé soit par hydrolyse en glucose-6-phosphate, soit par son activité coenzymatique sur la phosphohexomutase purifiée Boehringer (⁶).

II. RÉSULTATS. — a. Avec l'hémolysat entier (tableau I), la synthèse du G 1,6 DP nécessite la présence d'ATP et peut se faire à partir des deux glucoses monophosphates.

b. Après adsorption sur DEAE-cellulose, qui élimine l'hémoglobine et le G 1,6 DP globulaire, le G 1 P forme du G 1,6 DP, qui active la phosphohexomutase et du G 6 P apparaît. Inversement, le G 6 P ne peut se transformer en G 1 P (absence de G 1,6 DP).

Le G 1 P est donc le seul substrat de la synthèse du G 1,6 DP. Les monophosphoglycérates augmentent l'activité, alors que le 2,3 DPG est sans action.

c. Après purification sur colonne de DEAE-cellulose, l'enzyme est débarrassée de la phosphoglycerate mutase : seul le 3 PG est alors activateur.

d. Sur l'enzyme purifiée par relargage en sulfate d'ammonium, la production de G 1,6 DP en présence d'ATP et de 3 PG est variable (tableau II), mais l'addition de phosphoglycerate kinase purifiée (Boehringer) à très faible concentration (0,9 unité) double la production de G 1,6 DP (la PGK sans l'enzyme purifiée est sans action). La phosphoglycerate kinase intervient vraisemblablement selon le schéma :

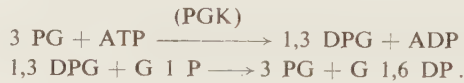


TABLEAU I

*Formation de G 1,6 DP à partir de l'hémolysat partiellement purifié
(Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre d'échantillons de la moyenne)*

	G 6 P formé	G 1.6 DP formé
	μmoles	
a. <i>Hémolysat.</i>		
— G 1 P sans ATP	13,5 (3)	0 (3)
— G 1 P + ATP 6 mM	2,4 (3)	0,257 (3)
— G 6 P + ATP 6 mM		0,317 (3)
b. <i>Hémolysat après DEAE-cellulose.</i>		
— G 1 P	0,457	0,048
— G 1 P + 3 PG	0,329	0,176
— G 1 P + 2 PG	0,284	0,131
— G 6 P	—	0
— G 6 P + 3 PG	—	0,03
— G 6 P + 2 PG	—	0,04
c. <i>Purification colonne DEAE.</i>		
— G 1 P + 3 PG	0,473 (6)	0,178 (6)
— G 1 P + 2 PG (N.B.)	0,492	0,036

a : Mg ++ 10 mM ; G 1 P ou G 6 P, 6 mM ; hémolysat, 2 ml ; dans 5 ml ; 30 mn/37°.

b et c : Mg ++ 12 mM ; G 1 P ou G 6 P, 6 mM ; ATP, 10 mM ; 2 PG ou 3 PG, 6 mM, dans 5 ml, 60 mn/37°.

(N. B. — Le 2 PG Boehringer contient des traces de 3 PG ce qui explique la faible production de G 1,6 DP, suffisante pour activer la PHM et former du G 6 P.)

TABLEAU II

*Formation de G 1,6 DP à partir de la fraction purifiée
par précipitation au sulfate d'ammonium*

	G 6 P formé	G 1,6 DP formé
	μmoles	
1. 3 PG sans PGK.....	0,281 (4)	0,134 (4)
+ PGK.....	0,358 (4)	0,326 (4)
2. GA 3 P + TPD + NAD + .	0,235 (4)	0,175 (4)
3. 1,3 DPG.....	0,02	0,140

1 : Mg ++, 12 mM ; G 1 P, 6 mM ; ATP, 10 mM ; 3 PG, 6 mM ; PGK, 0,9 unité, dans 5 ml ; 60 mn/37°.

2 : Mg ++ 6 mM ; G 1 P, 6 mM ; PO 4, 20 mM, GA 3 P, 4 mM ; NAD +, 0,3 mM ; TPD, 1,8 unité dans 5 ml ; 180 mn/37°.

3 : Mg ++ 6 mM ; G 1 P, 6 mM ; 1,3 DPG, 1 mM dans 5 ml ; 60 mn/20°.

Pour vérifier cette hypothèse, l'enzyme a été incubée dans un milieu phosphaté dépourvu d'ATP, avec le système GA 3 P/triosephosphate deshydrogenase/NAD +, ou avec du 1,3 DPG (préparé selon Negelein) (7) : dans les deux cas, une production de G 1,6 DP a lieu.

III. DISCUSSION. — L'enzyme du globule rouge humain responsable de la synthèse du glucose-1,6-diphosphate est vraisemblablement identique à celle que Levey et Alpers (8) ont isolée du foie de rat, dont l'activité à partir d'un certain degré de purification nécessite la présence de 3 PG et diffère par ce caractère de celle de Eyer et Pette (9).

Toutefois, l'enzyme purifiée n'est activée que par le 3 PG : le 2 PG (ou le 2,3 DPG) est sans effet. En réalité, le 3 PG intervient comme précurseur du 1,3 DPG (en présence de PGK et d'ATP), ce dernier constituant l'agent phosphorylant du glucose-1-phosphate.

Comme le montre la production de G 6 P dans les tableaux I et II, nous n'avons jamais pu éliminer au cours de la purification, l'activité phosphohexomutase.

Récemment, Alpers (10) a montré que la phosphohexomutase commerciale (Boehringer) forme du G 1,6 DP à partir du G 1 P et du 1,3 DPG.

Le mécanisme de cette phosphorylation rejoint nos propres résultats expérimentaux, qui mettent en évidence la possibilité de cette voie de synthèse du glucose-1,6-diphosphate dans l'érythrocyte humain.

G 1 P, glucose-1-phosphate ; G 6 P, glucose-6-phosphate ; G 1,6 DP, glucose-1,6-diphosphate ; 2 PG, phospho-2-glycérate ; 3 PG, phospho-3-glycérate ; 1,3 DPG, 1,3-diphosphoglycerate ; 2,3-DPG, 2,3-diphosphoglycerate ; GA 3 P, glyceraldehyde-

3-phosphate ; PHM, phosphohexomutase ; PGK, phosphoglycerate kinase ; TPD, triose-phosphate-deshydrogenase ; PGM, phospho-glycerate mutase.

(*) Séance du 22 juillet 1968.

- (1) A. C. PALADINI, R. CAPUTTO, L. F. LOLOIR, R. E. TRUCCO et C. E. CARDINI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 23, 1949, p. 55.
- (2) L. F. LOLOIR, R. E. TRUCCO, C. E. CARDINI, A. C. PALADINI et R. CAPUTTO, *Arch. Biochem. Biophys.*, 24, 1949, p. 65.
- (3) M. HENNESSEY, A. WALTERSDORPH, F. HUENNEKENS et B. GABRIO, *J. Clin. Invest.*, 41, 1962, p. 1257.
- (4) H. TEMKINE, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 48, 1966, p. 771.
- (5) P. CARTIER et H. TEMKINE, *Ann. Biol. Clin.*, 25, 1967, p. 1119.
- (6) V. A. NAJJAR, in P. P. BOYER, H. LARDY et K. MYRBACK, *The Enzyms*, Academic Press, 6, 1962, p. 161.
- (7) E. NEGELEIN, in S. P. COLOWICK et N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, 3, 1957, p. 216.
- (8) G. S. LEVEY et J. B. ALPERS, *J. Biol. Chem.*, 240, 1965, p. 4152.
- (9) P. EYER et D. PETTE, *Life Sciences*, 6, 1967, p. 191.
- (10) J. B. ALPERS, *J. Biol. Chem.*, 243, 1968, p. 1698.

(Enzymologie Médicale, Unité 75 I. N. S. E. R. M.,
149, rue de Sèvres, Paris, 15^e.)

LES ANOMALIES DE LA GLYCOLYSE AU COURS DE L'ANÉMIE HÉMO- LYTIQUE PAR DÉFICIT DU GLOBULE ROUGE EN PYRUVATE KINASE

P. CARTIER, A. NAJMAN, J. P. LEROUX ET H. TEMKINE

*Enzymologie Médicale, INSERM, Unité 75† Paris 15° et
Service d'Hématologie, C.H.U. Saint-Antoine*, Paris (France)*

(Reçu le 16 avril 1968)

SUMMARY

Anomalous Glycolysis in Hemolytic Anemia Due to Pyruvate Kinase Deficiency of Red Cells

In two cases of hemolytic anemia with pyruvate kinase deficiency, we have studied the modifications of glycolysis in red blood cells and the kinetic behaviour of pyruvate kinase.

Red cell glycolysis was markedly diminished. This alteration of the metabolic capacity coincides with an accumulation of phosphoenol pyruvate and phosphoglycerates and with a low level of hexose phosphates and triose phosphates. ATP content is very much decreased (35 % of normal values); 2,3-diphosphoglycerate is slightly increased. The level of pyridine nucleotides was found to be low, with predominance of reduced forms. These modifications are interpreted in relation to pyruvate kinase deficiency.

The kinetic studies of the purified enzyme revealed two forms of pyruvate kinase in normal erythrocytes as well as in pyruvate kinase-deficient cells:

— pyruvate kinase-B, with hyperbolic kinetics and K_m app. (phosphoenolpyruvate) = $3.6 \cdot 10^{-5}$ M, insensitive to fructose diphosphate.

— pyruvate kinase-A, with allosteric kinetics and K_m app. (phosphoenolpyruvate) = $19.3 \cdot 10^{-5}$ M. The allosteric form is activated by fructose diphosphate at very low concentrations (K_m app. (fructose diphosphate) = $43 \cdot 10^{-9}$ M). In activated A-form, K_m (phosphoenolpyruvate) is lowered at the same value as the B-form (= $2.8 \cdot 10^{-5}$ M). ADP is inhibitor at concentrations above $30 \cdot 10^{-5}$ M, and this action is overcome by fructose diphosphate. ATP inhibits at physiological concentrations.

Pyruvate kinase-A and pyruvate kinase-B have identical V_{max} and are interconvertible. The transition factors are discussed.

In this study, no differences appeared in the molecular structure of pyruvate kinase in normal and deficient cells.

† 149 rue de Sèvres.

* Professeur R. André.

INTRODUCTION

Depuis la découverte en 1961 par Valentine *et al.*¹ du déficit en pyruvate kinase dans les globules rouges de certains malades atteints d'anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire, de nombreux travaux ont précisé les caractères cliniques, hématologiques et biochimiques de cette anomalie. Les manifestations cliniques et hématologiques sont très variables, allant des formes hémolytiques graves de la première enfance à des formes modérées et stabilisées de l'enfant et de l'adulte, sans que l'on puisse établir une corrélation certaine entre la gravité et le déficit en pyruvate kinase. L'analyse génétique semble indiquer l'hétérogénéité du déficit enzymatique. Mais c'est surtout l'analyse biochimique qui est encore actuellement la moins complète et qui a donné lieu aux constatations les plus dispersées.

C'est pourquoi il nous a paru intéressant de rapporter deux nouvelles observations d'anémie hémolytique par déficit en pyruvate kinase érythrocytaire, différentes par le degré de réticulocytose. Ces deux enzymopathies ont fait l'objet d'une exploration biochimique assez complète qui nous permet de discuter le retentissement métabolique du déficit enzymatique et qui a mis en évidence le caractère allostérique de l'enzyme et son activation par le fructose 1,6-diphosphate.

Parmi les enzymopathies héréditaires associées à une anémie hémolytique non sphérocytaire, le déficit en pyruvate kinase est certainement celui qui retentit le plus directement sur le métabolisme glycolytique, donc énergétique, du globule rouge.

Les déficits en glucose-6-phosphate déshydrogénase et 6-phosphogluconate déshydrogénase ont des conséquences métaboliques très limitées. Le défaut de formation du TPNH qui en résulte pourrait ralentir certaines réductions auxquelles il participe de manière plus ou moins spécifique (en particulier, la réduction de la méthémoglobine et du glutathion, et peut-être la réduction des stéroïdes). Les deux enzymes ne participant pas à la dégradation du glucose par la voie d'Embden-Meyerhof, l'incidence de leur déficit sur la glycolyse et le métabolisme énergétique (en particulier sur la recharge de l'ATP) doit être nulle.

Le déficit en 2,3-diphosphoglycérate mutase se localise sur un enzyme (d'ailleurs de faible activité) de la dérivation de Rapoport-Luebering. C'est l'enzymopathie la plus mal définie biochimiquement : dans les rares cas où le 2,3-diphosphoglycérate a été dosé, son taux était abaissé de moitié, mais ici aussi, le retentissement sur la glycolyse apparaît peu vraisemblable.

Le déficit en triose phosphate isomérase enzyme important de la voie d'Embden-Meyerhof, devrait modifier la glycolyse ; d'autant que dans le cas unique rapporté par Schneider², l'activité érythrocytaire était inférieure au 1/10ème de la normale. En réalité, dans le spectre glycolytique du globule rouge, la triose phosphate isomérase est l'enzyme qui présente l'activité la plus élevée. Un déficit, même aussi important, maintient une activité très supérieure à celle des enzymes limitants. Il est par ailleurs possible que la formation de 3-phosphoglycéraldéhyde par le shunt des pentoses assure une suppléance suffisante pour que la glycolyse ne soit pas affectée. En réalité, l'étude de la glycolyse effectuée sur ce cas a montré qu'elle était augmentée.

Le déficit en pyruvate kinase est le seul qui se localise sur la voie glycolytique directe d'Embden-Meyerhof et qui intéresse un enzyme clé, et à une concentration qu'un déficit important transforme en étape limitante de la glycolyse. Par ailleurs, le déficit a une incidence directe sur la recharge de l'ATP. De toutes les enzymopathies

du globule rouge, c'est donc celle qui présente le plus grand intérêt biochimique et qui justifie le plus une exploration approfondie du métabolisme glucidique.

Des travaux antérieurement publiés se dégagent, parmi des données contradictoires, des résultats assez constamment retrouvés:

- la diminution de l'ATP
- l'augmentation de 2,3-diphosphoglycérate
- l'augmentation du phosphoenol pyruvate.

L'hypothèse d'une hétérogénéité des pyruvate kinases anormales analogue à celle des déficits en glucose-6-phosphate déshydrogénase était évidemment séduisante: la mutation intéresse-t-elle un gène de contrôle ou un gène de structure? Les études des propriétés électrophorétiques et surtout des caractéristiques cinétiques ont fourni des résultats si variables qu'ils ne permettent aucune conclusion. En particulier, les K_m sont selon les cas, abaissées, normales ou augmentées.

Nous voyons à ces divergences deux raisons: d'une part, la pyruvate kinase du globule rouge est un enzyme très labile et cette instabilité rend délicate sa purification; d'autre part, dans l'anémie du déficit en pyruvate kinase, la réticulocytose est de règle et elle dépasse très souvent 30%. Il est toujours difficile, sinon impossible, de déterminer dans les variations constatées la part qui revient aux réticulocytes. Forme intermédiaire entre les précurseurs médullaires et le globule rouge circulant, le réticulocyte est une cellule structurée avec des débris nucléaires, des mitochondries, etc., qui est le siège de réactions de synthèse multiples qui empruntent leur énergie à une glycolyse couplée au cycle tricarboxylique. La plupart des enzymes de la voie glycolytique ont une activité beaucoup plus élevée que dans le globule rouge, ce qui entraîne une glycolyse plus intense et un niveau très différent des divers phosphodérivés.

Dans le présent travail, nous avons étudié en détail la glycolyse de deux sujets atteints d'une anémie non sphérocytaire, associée à un déficit en pyruvate kinase. La comparaison de ces deux anémies est intéressante, car l'un présentait une nette réticulocytose (18%), l'autre une réticulocytose très faible.

OBSERVATIONS

Cas No. 1—Cou...

Garçon né en 1947, bien portant jusqu'en 1952. Depuis cette date, des poussées très brèves d'ictère surviennent plusieurs fois par an, accompagnées chaque fois d'une asthénie importante. En 1964, la nature hémolytique de ces ictères est mise en évidence: il existe alors une anémie modérée: 3560000 globules rouges par mm^3 , 3750 globules blancs par mm^3 , avec une réticulocytose élevée: 147000 par mm^3 . La durée de vie des hématies (^{51}Cr) montre un raccourcissement net mais modéré: $T_4 = 19$ jours (valeur normale $- 28 \text{ jours} \pm 4 \text{ jours}$) avec une séquestration diffuse sans prépondérance locale (Dr. Combrisson).

La nature exacte de cette anémie hémolytique n'est pas précisée, mais on constate une anomalie commune au sujet et à ses parents: macrocytose très nette des hématies, chez l'enfant: volume globulaire moyen $= 96 \mu^3$, chez le père: $112 \mu^3$, et chez la mère: $103 \mu^3$.

En octobre 1967, il existe un subictère net avec un taux de bilirubine libre à 22 mg: l'examen hématologique montre: 4100000 globules rouges par mm^3 , volume

globulaire moyen: $92 \mu^3$, teneur moyenne en hémoglobine d'une hématie: 28, concentration moyenne en hémoglobine des hématies: 26 %, 233 000 réticulocytes (5.7 %), 5100 globules blancs par mm^3 , 290 000 plaquettes.

Cas No. 2—*Fer*...

Chez cette fille née en 1943, le début clinique de la maladie est imprécis. Depuis son enfance, elle est asthénique et reçoit de très nombreux traitements sans qu'aucun diagnostic ne soit porté. En 1964, à l'occasion d'une hospitalisation pour ictère avec splénomégalie, l'anémie hémolytique est reconnue. Il n'y a pas d'anomalies morphologiques et le développement staturo-pondéral s'est effectué normalement.

L'anémie est importante: 201000 globules rouges par mm^3 , 2700 globules blancs par mm^3 , la réticulocytose élevée: 201000 par mm^3 (10.0 %). La bilirubine totale est à 48 mg/l, la bilirubine libre à 40 mg/l. La durée de vie des hématies marquées (^{51}Cr) est raccourcie: $T_{\frac{1}{2}} = 10$ jours (valeur normale = 28 jours $\pm$ 4 jours) et la séquestration tissulaire est mixte, hépatosplénique (Dr. Combrisson).

La nature de cette anémie hémolytique n'est pas précisée, mais on constate également une macrocytose globulaire chez la malade: volume globulaire moyen = $96 \mu^3$, chez le père: $100 \mu^3$, et chez la mère: $101 \mu^3$.

Devant la persistance de l'hémolyse et l'existence d'une lithiase vésiculaire, une splénectomie avec cholécystectomie est pratiquée le 2 février 65; elle est suivie d'une amélioration clinique et d'une amélioration hématologique très modérée. La durée de vie des hématies est inchangée, mais il apparaît une nette réticulocytose. En janvier 68, l'état hématologique est le suivant: 275000 globules rouges par mm^3 , 7400 globules blancs par mm^3 , 330000 plaquettes, 572000 réticulocytes par mm^3 (20.8 %), volume globulaire moyen: $116 \mu^3$.

TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

Le prélèvement de sang

Deux échantillons de sang sont prélevés*:

1 - l'un, sur héparine, dans un tube à centrifuger refroidi et agité. Sur deux micropipettes d'essais, on détermine l'hématocrite et le taux de réticulocytes. Deux prélèvements de 0.1 ml sont immédiatement extraits pour le dosage des pyridine nucléotides. Le reste est centrifugé immédiatement et le culot est lavé deux fois avec une solution de KCl 0.154 M refroidie. Sur ce culot globulaire seront effectuées:

- les dosages des activités des enzymes de la glycolyse,
- la mesure de l'activité glycolytique *in vitro*,
- la purification de la pyruvate kinase.

2 - l'autre est directement prélevé de la veine, sous agitation efficace (dans un tube à centrifuger refroidi et taré) sur 10 ml d'acide perchlorique 1.2 N. 10 ml de sang environ sont recueillis et le tube est à nouveau pesé pour connaître le volume précis du prélèvement. Après homogénéisation du défécât, le tube est centrifugé à 0°, le surnageant est prélevé et conservé dans un bain de glace. Le culot est remis deux fois en suspension homogène dans 5 ml d'acide perchlorique 0.6 N. Les surnageants rassemblés sont neutralisés dans la glace sous agitation, soit par CO_3HK solide, soit par

* Lors des prélèvements, Cou... n'avait jamais été transfusé, Fer... l'avait été trois mois avant.

KOH 5 *N* en évitant des surconcentrations locales. Après 15 min de contact, le précipité est éliminé et l'extrait perchlorique est aussitôt lyophilisé.

Le résidu sec est repris par l'eau bidistillée glacée et complété à un volume de 20 ml. Sur cet extrait perchlorique conservé dans la glace, on détermine le plus rapidement possible:

- les divers intermédiaires de la glycolyse,
- les nucléotides adényliques.

Techniques de dosage

Les techniques de dosage ont été précédemment détaillées:

- dosage des enzymes de la glycolyse³. Les activités sont exprimées en moles de substrat transformé par minute et par ml de globules rouges;
- dosage des intermédiaires de la glycolyse⁴;
- dosage du 2,3-diphosphoglycérate et du glucose-1,6-diphosphate⁵;
- dosage des pyridine nucléotides⁶. Les concentrations sont exprimées en nmoles par ml de globules rouges.

Mesure de l'activité glycolytique

Les globules rouges lavés (1 ml) sont remis en suspension dans 1 ml de liquide de Krebs-Ringer (isotonique (NaCl 115 mM; KCl 4 mM; MgCl₂ 5 mM; PO₄³⁻ 20 mM; glucose 10 mM)) ajusté très exactement à pH 7.40.

On prélève aussitôt 0.5 ml et la fiole est incubée à 37° à l'agitateur de Dubnoff. Un second prélèvement de 0.5 ml est effectué au bout de 3 heures. Les échantillons sont déféqués par 1 ml d'acide perchlorique 0.9 *M*. Le glucose est dosé enzymatiquement⁴. Le glucose consommé est exprimé en μ moles par heure pour 1 ml de globules rouges.

Purification de la pyruvate kinase

Les globules rouges lavés sont hémolysés par congélation (deux fois) à moins 20°. Les diverses étapes de la purification sont effectuées à +4° et réalisées en une journée. L'hémolysat est débarrassé de l'hémoglobine par la méthode d'Hennessey⁷: à un volume d'hémolysat sont ajoutés 1 volume d'eau et 2 volumes de suspension de DEAE-cellulose à 8%, dans du tampon PO₄ 1/300 *M*, pH 7.0. Cette suspension est agitée pendant 30 minutes à 0°. La cellulose est centrifugée et le surnageant (qui contient la majeure partie de l'hémoglobine) est éliminé. La cellulose est lavée quatre fois en tampon PO₄ 1/300 *M*, pH 7.0.

Les enzymes sont élués en ajoutant à la DEAE-cellulose une solution de KCl 0.5 *M* en tampon PO₄ 1/300 *M*, pH 7.0, le volume d'éluant correspondant au volume d'hémolysat initial. Après 1 heure de contact sous agitation, la suspension est centrifugée. Le surnageant est filtré.

A la fraction éluee, on ajoute une solution de sulfate d'ammonium saturée, neutralisée à pH 7.4 par NH₄OH, jusqu'à atteindre 20% de la saturation. Après centrifugation, le surnageant est amené à la concentration finale de 40% en SO₄(NH₄)₂.

Le précipité où se trouve concentrée l'activité kinasique est dissous dans 2 ml d'eau bidistillée et additionné de 5 μ l de mercaptoéthanol. L'activité spécifique de la pyruvate kinase après purification est d'environ 80 fois celle de l'hémolysat, avec un rendement de récupération (calculé sur l'hémolysat initial) de l'ordre de 25%. Sur

chaque préparation, on vérifie l'absence des enzymes qui pourraient interférer dans l'étude cinétique (en particulier, phosphopyruvate hydratase, fructose diphosphatase, aldolase et DPNH oxydase).

RÉSULTATS

Précisons d'abord le degré de réticulocytose et la valeur d'hématocrite des divers prélèvements:

		Réticulocytes	Hématocrite
Cou...	(8.11.67)	3 %	36.5
	(24. 1.68)	2 %	38.0
Fer...	(11. 9.67)	18 %	29.0
	(31. 1.68)	15 %	32.0

Les modifications de la glycolyse

L'intensité de la glycolyse. A condition de fixer étroitement le pH d'incubation, l'activité glycolytique du globule rouge est très constante. La consommation du glu-

TABLEAU I

ACTIVITÉS DES ENZYMES GLYCOLYTIQUES

(Exprimées en moles de substrat transformé par ml de globules rouges et par minute.)

Enzymes	Normaux	Cou...	% normale	
			Fer...	% normale
PHM	0.296	0.48	0.48	162
HK	0.143	0.22	0.48	336
PHI	6.96	6.82	6.42	92
PFK	0.802	1.82	2.55	318
Al	0.377	0.63	0.83	220
TPI	257.7	375	331.2	129
GAPD	11.4	19.5	17.4	152
PGK	26.7	36.3	23.4	88
PGM	4.66	4.77	—	—
Eno	1.45	2.50	2.76	190
PK	2.78	1.25	0.91	33
LDH	16.8	31.8	33.8	201
G-6-PD	1.27	1.25	1.66	131
6-PGD	0.54	0.54	0.55	102

Abréviations

PHM	Phosphohexomutase
HK	Hexokinase
PHI	Phosphohexoisomérase
PFK	Phosphofructokinase
Al	Aldolase
TPI	Triosephosphate isomérase
GAPD	Phosphoglyceraldéhyde déshydrogénase
PGK	Phosphoglycérate kinase
PGM	Phosphoglycérate mutase
Eno	Phosphopyruvate hydratase
PK	Pyruvate kinase
LDH	Lactico déshydrogénase
G-6-PD	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
6-PGD	6-phosphogluconate déshydrogénase

Nomenclature I.U.B.—E.C.

2.7.5.1
2.7.1.1
5.3.1.9
2.7.1.11
4.1.2.13
5.3.1.1
1.2.1.12
2.7.2.3
2.7.5.4
4.2.1.11
2.7.1.40
1.1.1.27
1.1.1.49
1.1.1.44

cose est en moyenne de 1.31 μ mole par ml et par heure ($\sigma = \pm 0.24$). Chez Fer..., malgré la réticulocytose, sa consommation était de 0.99 (11.9.67) et 1.13 (31.1.68) μ moles. Chez Cou..., l'activité glycolytique était plus nettement abaissée: 0.73 μ mole (24.1.68).

L'activité des enzymes de la glycolyse (Tableau I): Le déficit en pyruvate kinase est modéré (diminution de 55 %) chez Cou..., plus important (diminution de 67 %) chez Fer...

Chez ce dernier qui présente le taux de réticulocytes le plus élevé, l'activité de la plupart des enzymes glycolytiques est nettement augmentée. Chez Cou..., bien que la réticulocytose soit très discrète, on constate également une élévation d'activité qui s'explique par la prédominance d'une population de globules rouges jeunes ($T_{\frac{1}{2}}$ de 68 % de la normale).

Il convient toutefois de souligner que ces variations n'affectent pas les deux enzymes d'entrée dans la voie des pentoses (glucose-6-phosphate déshydrogénase et 6-phosphogluconate déshydrogénase), et que dans les deux cas, la phosphohexo isomérase demeure normale; cet enzyme est le seul qui conserve dans le globule rouge jeune et dans le réticulocyte une valeur d'activité très voisine de celle du globule rouge d'une population normale. Inversement, l'activité hexokinase est considérablement plus élevée (8 à 15 fois) dans le réticulocyte, ce qui explique la forte augmentation chez Fer...

TABLEAU II

CONCENTRATION INTRAGLOBULAIRE DES PHOSPHODÉRIVÉS DE LA VOIE GLYCOLYTIQUE
Exprimée en nmoles par ml de globules rouges.)

	Valeurs normales	Cou...				Fer...			
		8.11.67	%	24.1.68	%	11.9.67	%	31.1.68	%
Glucose-6-phosphate	31	18.8	60	19.9	64	121.7	393	76.8	248
Fructose-6-phosphate	10	5.4	54	7.5	75	38.9	389	26.6	266
Glucose-1,6-diphosphate	4	4.0	(100)	3.0	75	—	—	5.0	125
Trioses phosphates	19	10.7	56	9.9	52	24.3	128	23.0	124
3-Phosphoglycérate	66	115.2	175	99.6	151	116.9	177	133	202
2-Phosphoglycérate	12	16.4	137	19.9	166	14.6	122	20.1	168
Phosphoenol pyruvate	17	40.2	237	39.8	234	43.8	258	44.3	261
Glucose-1,6-diphosphate	97	61.6	64	54.8	56.5	182	188	108	111
3-Diphosphoglycérate	4580	4800	105	5380	117	4430	97	5048	110

Le bilan des phosphodérivés intermédiaires de la glycolyse (Tableau II). Ce qui frappe d'abord dans la comparaison des deux malades, c'est:

- d'une part, la concordance des résultats chez le même sujet sur deux prélèvements espacés de quatre mois;
- d'autre part, la discordance des concentrations des intermédiaires des deux malades.

Les valeurs concernant Fer... sont manifestement faussées par le taux plus élevé de réticulocytes et nous en discuterons plus loin les valeurs significatives.

Dans le cas de Cou..., la répartition des intermédiaires est très nettement modifiée:

- (a) Dans la voie directe d'Embden-Meyerhof, les phosphodérivés en amont des phosphoglycérates sont diminués, ceux situés en aval sont augmentés. L'inversion se

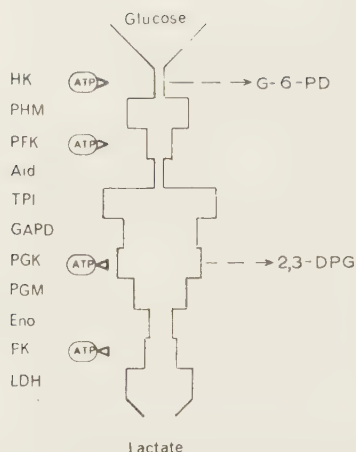


Fig. 1. Spectre des enzymes glycolytiques du globule rouge humain. (La largeur de la zone figurant chaque enzyme est proportionnelle au log de l'activité. Abréviations voir sous les Tableaux I et II.)

localise au niveau de l'oxydation des trioses phosphates, qui apparaît très nettement dans la Fig. 1.

(b) La teneur en 2,3-diphosphoglycérate (caractéristique de la déviation de Rapport-Luebering) n'est que très légèrement augmentée, ce qui contraste avec les valeurs plus élevées signalées par certains auteurs.

(c) Le glucose-1,6-diphosphate, autre diphosphodérivé qui ne s'accumule que dans le globule rouge, est abaissé à un même degré que les hexoses phosphates. Ce diphosphate est habituellement à une concentration remarquablement constante, même lorsque l'activité glycolytique se ralentit (par exemple, au cours de la conservation du sang en acide citrique glucose⁵).

TABLEAU III

CONCENTRATION INTRAGLOBULAIRE DES PHOSPHODÉRIVÉS ADÉNYLIQUES
(Exprimée en nmoles par ml de globules rouges.)

	Valeurs normales (m)	Cou...				Fer...			
		8.11.67	%	24.1.68	%	11.9.67	%	31.1.68	%
ATP	1530	536	35	498	33	1190	78	863	56
ADP	170	129	76	119	70	243	143	200	118
AMP	20	37	185	37	185	44	220	53	270
Nucléotides adényliques totaux	1720	702	41	644	38	1477	86	1116	65

Le bilan des nucléotides adényliques (Tableau III). Des discordances analogues, pour lesquelles on peut proposer une même explication apparaissent dans la teneur en nucléotides adényliques: dans les deux enzymopathies, la teneur en ATP est diminuée, mais beaucoup plus nettement chez Cou..., bien que son déficit en pyruvate kinase soit plus discret: la teneur plus élevée du réticulocyte en ATP estompé l'effondrement que l'on devrait constater dans les globules rouges de Fer...

Chez Cou..., la recharge de l'ATP au niveau de la pyruvate kinase est diminuée

et son taux s'abaisse au 1,3 de la valeur normale. Le défaut de recharge s'accompagne d'une élévation de l'AMP et d'une chute de la somme des nucléotides adénilyques.

Les pyridine-nucléotides (Tableau IV). Les données de la littérature sur la teneur des globules rouges en pyridine-nucléotides et sur leurs variations pathologiques sont peu abondantes. Leur dosage dans le globule rouge est rendu délicat par la difficulté d'extraire quantitativement les formes réduites et oxydées sans modifier leur équilibre. La technique de "recycling" que nous avons utilisée est d'une sensibilité telle qu'elle autorise une dilution de l'extrait qui élimine ces difficultés.

TABLEAU IV

CONCENTRATION INTRAGLOBULAIRE DES FORMES OXYDÉES ET RÉDUITES DES PYRIDINE-NUCLÉOTIDES

(Exprimée en nmoles par ml de globules rouges.)

Sujets	DPN	DPNH	TPN	TPNH	Somme DPN	Somme TPN	$\frac{DPNH}{DPN}$	$\frac{TPNH}{TPN}$
Adultes normaux	84.2	54.9	30.8	15.8	139	46.6	0.65	0.54
$\sigma =$	± 2.6	± 1.8	± 1.5	± 0.9	± 5.1	± 2.0	± 0.02	± 0.03
Cou... 24.1.68	50.8	39.4	33.1	23.3	90.2	56.4	0.78	0.70
σ	60	72	107	147	65	121	120	130
Fer... 31.1.68	41.6	42.9	31.9	20.2	84.5	52.1	1.03	0.63
σ	49	78	104	128	61	112	158	117

Chez ces deux déficits, la teneur globale en DPN est diminuée, celle en TPN augmentée. L'équilibre des formes réduites et oxydées, exprimé par le rapport PN réduits/PN oxydés est déplacé vers une accumulation des formes réduites. Cette augmentation est la plus marquée avec le TPNH, ce qui indiquerait une participation plus importante de la voie oxydative directe du glucose-6-phosphate. La prédominance de la forme réduite du DPN correspond au blocage de l'équilibre d'oxydo-réduction 3-phosphoglyceraldéhyde/pyruvate au niveau de la pyruvate kinase.

Discussion

Mesurées *in vitro* dans les conditions optima, les activités des divers enzymes de la chaîne glycolytique fournissent une indication sur les points de contrôle de la séquence. Les réactions catalysées par les enzymes ayant l'activité la plus faible constituent des goulots d'étranglement qui imposent leur vitesse à la dégradation du glucose. Ces enzymes limitants correspondent généralement à des enzymes-clés qui catalysent des réactions énergétiquement importantes et irréversibles. Dans le globule rouge, il est admis que la séquence métabolique est réglée en trois points (Fig. 1) : le premier se situe au niveau de l'hexokinase, qui règle l'entrée du glucose dans la voie d'Embden-Meyerhof, module l'intensité de la glycolyse et empêche l'accumulation des intermédiaires. Le second, au niveau de la phosphofructokinase précède la coupure du glucose en deux trioses. Ces deux étapes irréversibles nécessitent de l'ATP.

La pyruvate kinase représente le troisième enzyme-clé, qui se localise en fin de chaîne et est indispensable à la recharge de l'ATP. Son activité est relativement faible et un déficit en pyruvate kinase crée un goulot d'étranglement qui freine la glycolyse

- d'une part, directement en limitant la vitesse de la séquence enzymatique;
- d'autre part, indirectement par le défaut de recharge de l'ATP, recharge nécessaire aux étapes kinasiques initiales de la glycolyse.

Les deux enzymopathies dont nous rapportons l'exploration métabolique sont intéressantes à des titres différents.

Dans le cas de Fer..., le déficit en pyruvate kinase est plus important. Mais, la réticulocytose, bien que modérée, fausse les modifications métaboliques. Le spectre enzymatique de la population érythrocytaire est manifestement déformé par la superposition du spectre des réticulocytes à celui des globules rouges. Dans le réticulocyte, l'hexokinase est l'enzyme de la voie d'Embden-Meyerhof le plus augmenté (8 à 12 fois), cette augmentation au niveau de l'entrée du glucose associée au freinage de la sortie (au niveau de la pyruvate kinase) explique l'accumulation des phosphodérivés constatée.

Dans le cas de Cou..., l'absence de réticulocytes donne au déficit en pyruvate kinase une expression métabolique plus aisément interprétable. Avant de discuter les résultats, soulignons d'abord les points importants:

- la glycolyse est très nettement diminuée,
- la recharge de l'ATP est fortement entravée,
- le taux de 2,3-diphosphoglycérate est à la limite des valeurs normales,
- les phosphodérivés intermédiaires sont très diminués jusqu'au stade d'oxydation du triose phosphate, fortement augmentés en aval de ce carrefour.

L'équilibre d'oxydoréduction des pyridine-nucléotides est déplacé en faveur de la forme réduite.

Ces modifications sont schématisées dans la Fig. 2. Il est logique de tenter d'analyser ces résultats en partant du déficit en pyruvate kinase, qui a directement une double conséquence:

- une diminution de l'utilisation du phosphoenol pyruvate, qui s'accumule

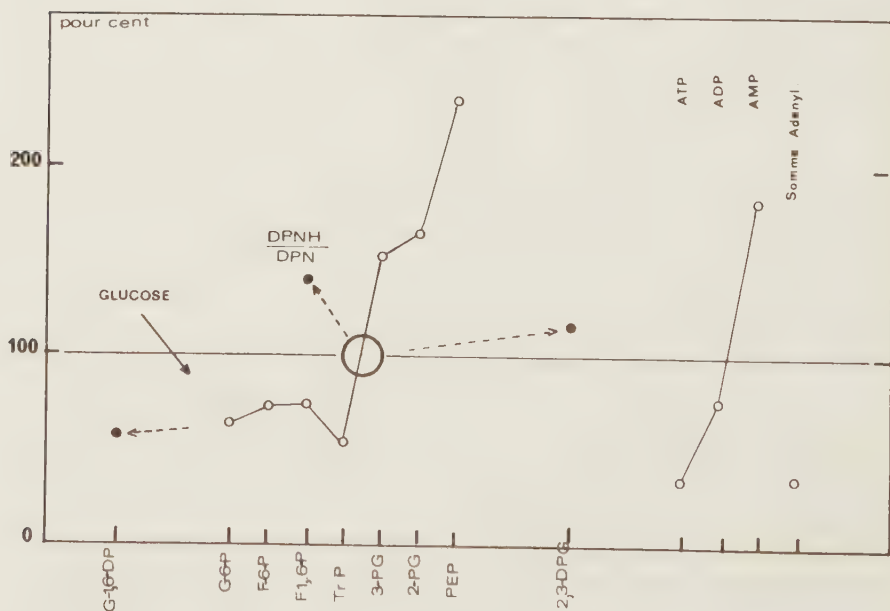


Fig. 2. Modifications de la concentration intraglobulaire des intermédiaires de la glycolyse chez Cou... (Exprimées en pourcentage des valeurs normales).

comme divers auteurs l'avaient signalé précédemment, et un freinage par ce goulot d'étranglement de l'ensemble de la glycolyse.

— une forte diminution de la recharge de l'ADP en ATP, dont la concentration tombe à 35% de la valeur normale.

L'abaissement de la concentration intracellulaire normale de l'ATP (1.5 mM) retentit sur les réactions kinasiques. La K_m (ATP) de la phosphofructokinase (0.018 mM) est très inférieure à cette concentration pathologique et la diminution de l'ATP ne peut que favoriser la formation du fructose diphosphate. Par contre, la K_m (ATP) de l'hexokinase (1 mM environ) se situe dans la zone de concentration intracellulaire de l'ATP: une diminution au 1/3 de celle-ci ralentit fortement l'entrée du glucose dans la voie glycolytique, ce qui entraîne un niveau bas des hexoses phosphates (et indirectement la chute du glucose-1,6-diphosphate formé aux dépens du glucose-1-phosphate) et des trioses phosphates.

Le schéma dans la Fig. 2 met en évidence un "cross over" qui se situe au stade d'oxydation du triose phosphate. Le déficit en pyruvate kinase se répercute en amont par une accumulation des substrats, qui remonte jusqu'au premier carrefour: le branchement sur la voie d'Embden-Meyerhof de la dérivation du 2,3-diphosphoglycérate. L'accumulation des substrats en aval de la phosphoglycérate kinase devrait par action de masse favoriser la réversibilité de la phosphoglycérate kinase et d'une part, alimenter la déviation de Rapoport-Luebering, et d'autre part, limiter le déséquilibre entre phosphoglycérates et triosesphosphates. En réalité, cette réversibilité est rendue impossible par la faible concentration en ATP qui tombe en dessous de la K_m de l'ATP, vis-à-vis de la phosphoglycerate kinase ($0.43 \cdot 10^{-3} M$). Les trioses phosphates issus d'une glycolyse ralentie, s'écoulent vers la dérivation accessoire et entretiennent un niveau normal ou élevé en 2,3-diphosphoglycérate.

Pour la plupart des auteurs, l'augmentation du 2,3-diphosphoglycérate serait une caractéristique majeure de l'enzymopathie, qui s'expliquerait par un passage accru de la glycolyse vers la dérivation de Rapoport-Luebering, et qui aurait pour conséquence d'aggraver le déficit en ATP. Il nous paraît vraisemblable d'attribuer l'augmentation du 2,3-diphosphoglycérate à la très forte réticulocytose de cette forme d'anémie. Dans les valeurs publiées par Grimes⁸, le 2,3-diphosphoglycérate est d'autant plus haut que le taux de réticulocytes est plus élevé et nous avons constaté, comme Keitt⁹ dans des anémies diverses avec réticulocytose, des taux de 2,3-diphosphoglycérate très nettement supérieurs à la normale.

La diminution de l'utilisation du phosphoenol pyruvate provoque parallèlement une diminution de la formation de lactate et de l'oxydation du DPNH: ce qui se traduit par l'élévation du rapport DPNH/DPN⁺ et constitue un facteur supplémentaire de freinage de la glycolyse au niveau de l'oxydation du phosphoglycéraldéhyde.

Les caractères de la pyruvate kinase

Plusieurs travaux ont étudié la constante de Michaelis de la pyruvate kinase vis-à-vis du phosphoenol pyruvate. Les valeurs sont anormalement dispersées (Tableau V).

Il convient de noter que la plupart des déterminations d'activité pyruvate kinasique de la littérature sont effectuées selon la technique originale de Valentine et Tanaka¹⁶ qui fixe la concentration en phosphoenol pyruvate à $150 \cdot 10^{-5} M$. Les

TABLEAU V

CONSTANTE DE MICHAELIS DE LA PYRUVATE KINASE DU GLOBULE ROUGE VIS-À-VIS DU PHOSPHOENOL PYRUVATE

Les valeurs de K_m ont été calculées approximativement à partir des courbes de Campos*. 4 sujets normaux**, 4 déficits homozygotes***, 4 déficits hétérozygotes****.

Auteur	N = Normal D = Déficient	pH	Mg ²⁺ mM	K ⁺ mM	ADP 10 ⁻⁵ M	K _m 10 ⁻⁵ M
Campos ¹⁰	N	7.4	16	75	5 6.2 8.7 12.5 25	120* 130 160 220 420
Rose ^{11,12}	N D N	7.4	5	25	15	6.5 1.0 8.0
Lohr ¹³	N D D	?	?	?	?	33 75 130
Wiemann ¹⁴	N Brut N Purifié D Brut D Purifié	7.5	?	?	?	19 140 9 110
Boivin ¹⁵	N** D*** D****	7.5	8	75	25	45 12 à 280 40 à 70

valeurs élevées de K_m du phosphoenol pyruvate du Tableau V sont dans la zone de concentration du phosphoenol pyruvate du dosage, c'est-à-dire que les dosages d'activité pyruvate kinasique des sujets seraient sans valeur, puisque réalisés dans un système non saturé en substrat.

La constante de Michaelis est déduite d'une représentation graphique de la vitesse de la réaction en fonction de la concentration en substrat. La représentation la plus utilisée est celle de Lineweaver-Burk qui exprime la relation $1/v = f(1/s)$. C'est une détermination délicate qui nécessite la mesure précise d'un nombre suffisant de points expérimentaux. Mais cette constante qui reflète l'affinité de l'enzyme pour

TABLEAU VI

CARACTÉRISTIQUES CINÉTIQUES DES DEUX FORMES DE PYRUVATE KINASE DU GLOBULE ROUGE

	Forme B (michaélienne)	Forme A (allostérique)
K_m app. (PEP)		
sans FDP	$3.6 \cdot 10^{-5} M$	$19.3 \cdot 10^{-5} M$
avec FDP	$2.7 \cdot 10^{-5} M$	$2.8 \cdot 10^{-5} M$
K_m app. (FDP)	—	$43.0 \cdot 10^{-9} M$
n de Hill		
sans FDP	0.99	1.88
avec FDP	1.01	1.00
Incubation 25°	B ←————— A	
4'	B —————→ A	

PEP: Phosphoenol pyruvate.

FDP: Fructose 1,6-diphosphate.

son substrat se détermine sur une préparation purifiée de l'enzyme (donc suppose que la purification n'en a pas modifié les propriétés, et Boivin¹⁵ signalait récemment des différences importantes de la K_m du phosphoenol pyruvate selon l'origine de la DEAE-cellulose), et n'a de valeur absolue que dans des conditions expérimentales déterminées: dans le cas de la pyruvate kinase, pH, concentration en K^+ , en Mg^{2+} , en ADP¹⁰.

La cinétique de la réaction pyruvate kinasique a été établie sur 16 préparations différentes d'enzyme purifié (12 sujets adultes normaux, 2 provenant de Fer..., 2 de Cou...) (pH 7.40; Mg^{2+} 8 mM; K^+ 50 mM; ADP 0.2 mM).

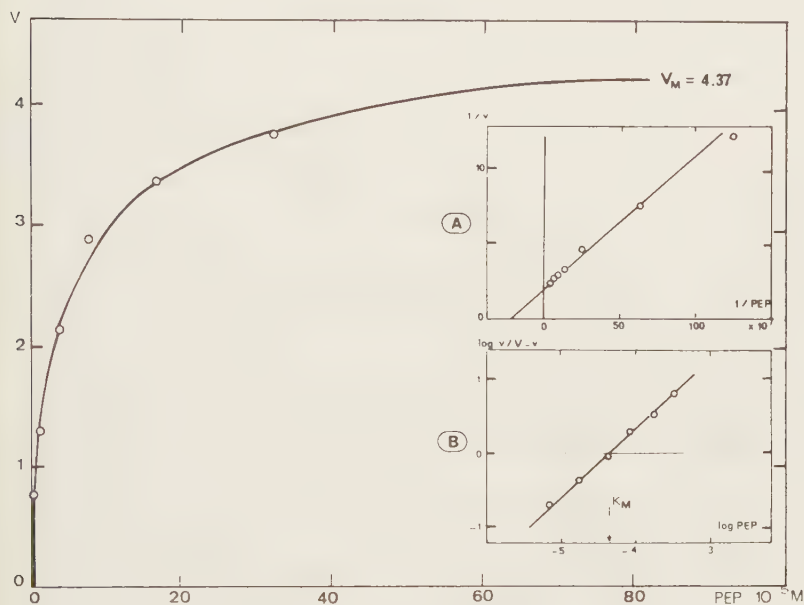


Fig. 3. Cinétique michaelienne de la pyruvate kinase B (Cou...) (en l'absence de fructose diphosphate). A: représentation selon Lineweaver-Burk: K_m (PEP) = 4.2; B: représentation selon Hill: K_m (PEP) = 4.3; $n = 0.96$.

Les courbes de vitesse en fonction de la concentration en phosphoenol pyruvate varient d'une préparation à l'autre:

— les unes ont un comportement michaelien (pyruvate kinase-B): la courbe est une hyperbole classique (Fig. 3) et les valeurs de la constante de Michaelis vis-à-vis du phosphoenol pyruvate sont très constantes ($3.6 \cdot 10^{-5} M \pm 0.3$; $n = 7$). Le fructose diphosphate active très faiblement l'enzyme sans modifier pratiquement sa K_m (phosphoenol pyruvate) ($2.5 \cdot 10^{-5} M$);

— les autres ont un comportement allostérique (pyruvate kinase-A): la courbe est une sigmoïde (Fig. 4) et la vitesse maximum (V_{max}) est atteinte pour des concentrations en phosphoenol pyruvate plus élevées. Cette forme allostérique est actuellement en cours d'étude. Nous pouvons souligner¹⁷ que:

(1) la forme allostérique A a une K_m apparente pour le phosphoenol pyruvate beaucoup plus élevée que la forme B. La représentation classique de Lineweaver-Burk

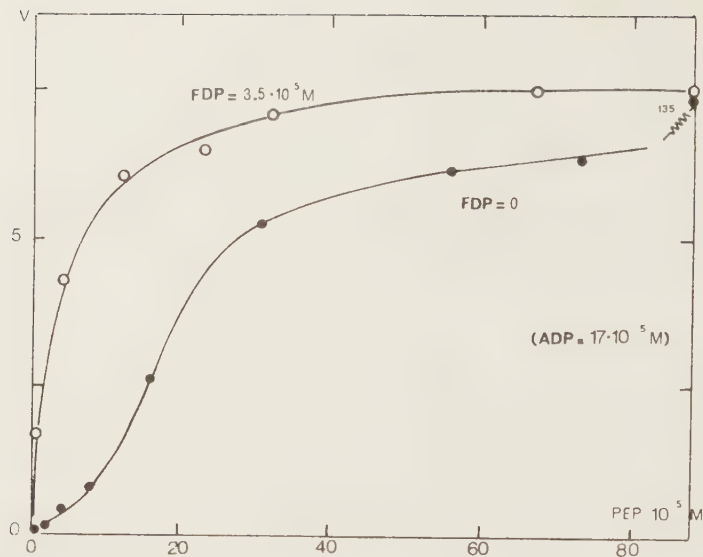


Fig. 4. Cinétique allostérique de la pyruvate kinase B (Cou...) en l'absence de fructose 1,6-diphosphate (FDP) et sa transformation michaélienne en présence de FDP.

$(1/V = f(1/\text{phosphoenol pyruvate}))$

est ici inutilisable et pour déterminer la K_m (phosphoenol pyruvate) app., on doit recourir à la représentation dite "de Hill"

$$\left(\log \frac{v}{V_{\max} - v} = f(\log \text{phosphoenol pyruvate}) \right)$$

la valeur de K_m app. correspond à la concentration en phosphoenol pyruvate pour laquelle

$$\log \frac{V}{V_m - v} = 0.$$

Sur 9 préparations, elle était de 19.3 ± 2.9 (Fig. 5).

(2) Comme les pyruvate kinases du foie¹⁸ et de levure¹⁹, la forme allostérique A, aux faibles concentrations en phosphoenol pyruvate est activée par le fructose diphosphate à de très faibles concentrations (K_m (fructose diphosphate) = $43 \cdot 10^{-9}$ M). Le fructose diphosphate transforme la courbe sigmoïde d'activité ($v = f(\text{PEP})$) en une hyperbole michaélienne, cependant la K_m du phosphoenol pyruvate s'abaisse à la même valeur que la forme B (2.8 ± 0.3 ; $n = 5$). Le 3'5'-AMP est sans action²⁰.

(3) la forme A est inhibée lorsque la concentration en ADP dépasse $30 \cdot 10^{-5}$ M et cette inhibition est levée par le fructose diphosphate à concentration saturante.

(4) enfin, l'ATP, inhibiteur, transforme la cinétique michaélienne en une cinétique allostérique.

Ces deux formes, pyruvate kinase A et B, ont une vitesse maximum identique. Les sensibilités différentes au fructose diphosphate traduisent une transformation qu'illustrent les variations du coefficient n de Hill. La forme allostérique présente deux

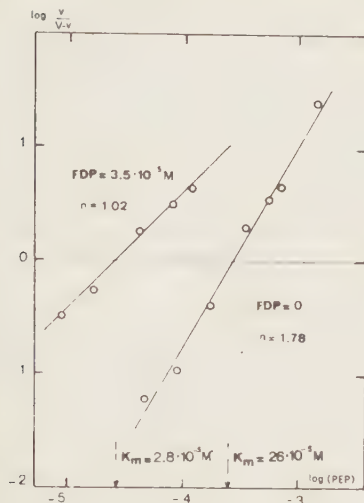


Fig. 5. Représentation selon Hill des données de la Fig. 4.

sites actifs ($n = 1.81 \pm 0.03$; 8 préparations); dans la forme michaelienne, par contre ($n = 0.99 \pm 0.02$; 7 préparations), tout se passe comme s'il n'y avait qu'un seul site, ou, dans la conception de Monod et coll.²¹, l'enzyme est figé dans une forme non coopérative.

Sous l'effet du fructose diphosphate, la forme A se transforme en forme B ($n = 1.01 \pm 0.03$; 7 préparations).

Les deux formes sont interconvertibles. La transformation peut intervenir au cours de la purification et aussi bien les sangs normaux que les sangs des deux enzymopathies ont été obtenus sous les deux formes. Dans le cas de Fer..., une des préparations purifiées avait un caractère michaelien typique et était insensible au fructose diphosphate. Dans une autre préparation de Fer..., nous avons obtenu une cinétique anormale, intermédiaire entre celle des formes A et B et qui correspond à un état de transition, à un mélange des deux formes: le courbe expérimentale est la résultante des deux courbes caractéristiques sigmoïde et hyperbolique.

Les facteurs qui provoquent cette transition ne sont pas encore définis: par incubation à 25°, la forme A se transforme rapidement (en 120 minutes) en forme B; à +4°, la conversion inverse se produit, mais plus lentement (3 jours). Cette conversion est le résultat soit d'un équilibre entre structure monomère et dimère, soit d'une transition de conformation entre deux formes dimériques.

DISCUSSION

Tanaka²² a récemment montré que la pyruvate kinase du globule rouge est entièrement inhibée par les anticorps anti-pyruvate kinase_L: elle serait donc du type "liver" qui obéit à une cinétique allostérique. Notre étude confirme que la pyruvate kinase du globule rouge (normal ou déficient) existe sous deux formes interconvertibles, l'une michaelienne (pyruvate kinase-B), l'autre allostérique (pyruvate kinase-A). Cette constatation, analogue à celle de Pogson²³ avec la pyruvate kinase du tissu

adipeux, fournit certainement l'explication des divergences considérables des valeurs de K_m du phosphoenol pyruvate que nous rappelions dans le tableau, sans qu'il paraisse nécessaire d'invoquer une hétérogénéité des pyruvate kinases normales du globule rouge normal ou déficient: l'enzymopathie serait plus vraisemblablement liée à une simple diminution de l'enzyme normal, sans anomalies de la structure moléculaire.

Sous sa forme allostérique, la pyruvate kinase est activable par le fructose diphosphate à des concentrations (K_m (fructose diphosphate) = $43 \cdot 10^{-9}$ M) inférieures à celles qui existent normalement dans le globule rouge (de l'ordre de $4 \cdot 10^{-6}$ M). La constante d'activation est très inférieure à celles mesurées avec la pyruvate kinase de la levure¹⁹ ($0.3 \cdot 10^{-4}$ à $1 \cdot 10^{-3}$ M) et du foie¹⁸ ($0.5 \cdot 10^{-6}$ M).

Cette activation d'une réaction enzymatique se localisant en fin d'une chaîne métabolique, par un produit d'une réaction située en début de chaîne représente un moyen de contrôle symétrique du feed-back classique, et dénommé "feed-forward".

L'interconvertibilité des deux formes fournit au globule rouge sans doute une possibilité de modulation efficace de contrôle de l'activité glycolytique, sans que nous puissions sur les données actuelles de la cinétique enzymatique, en préciser le mécanisme. Il nous apparaît comme très vraisemblable que cette régulation allostérique est complexe et doit faire intervenir à la fois les concentrations du fructose diphosphate et des nucléotides adényliques.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Mademoiselle Claude Reyrolle pour sa précieuse collaboration technique à ce travail.

RÉSUMÉ

Nous avons étudié, dans deux cas d'anémie hémolytique congénitale par déficit en pyruvate kinase, les modifications glycolytiques des globules rouges et les caractères cinétiques de la pyruvate kinase.

La consommation de glucose est fortement diminuée. Cette altération métabolique s'accompagne d'une accumulation de phosphoenol pyruvate et de phosphoglycérates, tandis que les hexoses phosphates et les trioses phosphates sont abaissés. La concentration de l'ATP s'effondre à 35% des valeurs normales, et le 2,3-diphosphoglycérate augmente légèrement. Le taux des pyridine-nucléotides est bas, avec prédominance des formes réduites. Nous avons cherché à relier ces modifications au déficit en pyruvate kinase.

Les études cinétiques de l'enzyme partiellement purifié ont montré qu'il existe deux formes de pyruvate kinase dans le globule rouge humain, qu'il soit normal ou déficient:

— une pyruvate kinase-B, qui présente une cinétique hyperbolique, une K_m app. (phosphoenol pyruvate) = $3.6 \cdot 10^{-6}$ M, une insensibilité au fructose diphosphate.

— une pyruvate kinase-A, qui présente une cinétique allostérique et une K_m app. (phosphoenol pyruvate) = $19.3 \cdot 10^{-6}$ M. Cette dernière forme est activée par de très basses concentrations de fructose diphosphate (K_m app. = $43 \cdot 10^{-9}$ M). La pyruvate kinase-A activée par le fructose diphosphate retrouve la même K_m (phos-

phénol pyruvate) que la pyruvate kinase-B ($2.8 \cdot 10^{-5} M$). L'ADP inhibe à des concentrations supérieures à $30 \cdot 10^{-5} M$, inhibition levée par le fructose diphosphate. L'ATP est inhibiteur aux concentrations intracellulaires.

Les pyruvate kinase-A et B ont des $V_{\max}$ identiques et sont interconvertibles. Les facteurs de la transition sont discutés.

Cette étude ne met en évidence aucune modification de la structure moléculaire de la pyruvate kinase dans les érythrocytes déficients.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 W. VALENTINE, K. TANAKA ET S. MIWA, *Trans. Assoc. Am. Physicians*, 74 (1961) 100.
- 2 A. SCHNEIDER W. VALENTINE, M. HATTORI ET M. HEINS, *New Engl. J. Med.*, 272 (1965) 229.
- 3 P. CARTIER, J. P. LEROUX ET J. C. MARCHAND, *Ann. Biol. Clin.*, 25 (1967) 109.
- 4 P. CARTIER, J. P. LEROUX ET H. TEMKINE, *Ann. Biol. Clin.*, 25 (1967) 791.
- 5 P. CARTIER ET H. TEMKINE, *Ann. Biol. Clin.*, 25 (1967) 1119.
- 6 P. CARTIER, *European J. Biochem.*, 4 (1968) 247.
- 7 M. HENNESSEY, A. WALTERSDORF ET F. HUENNEKENS, *J. Clin. Invest.*, 41 (1962) 1257.
- 8 A. GRIMES, A. MEISLER ET J. DACIE, *Brit. J. Hematol.*, 10 (1964) 403.
- 9 A. KEITT, *Am. J. Med.*, 41 (1966) 762.
- 10 J. CAMPOS, R. KOLER ET H. BIGLEY, *Nature*, 208 (1965) 194.
- 11 I. ROSE ET J. WARMS, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 4848.
- 12 I. ROSE ET J. WARMS, *Federation Proc.*, 25 (1966) 220.
- 13 H. WALLER ET G. LOHR, *IX. Congr. Intern. Soc. Hematology, Lisbonne, 1963*, p. 257.
- 14 U. WIEMANN ET O. TONZ, *Nature*, 209 (1966) 612.
- 15 P. BOIVIN ET C. GALAND, *Nouvelle Rev. Franc. Hematol.*, 8 (1968) 201.
- 16 W. VALENTINE ET K. TANAKA, in *Methods in Enzymology*, Vol. 9, Academic Press, New York, 1966, p. 470.
- 17 P. CARTIER, H. TEMKINE ET J. P. LEROUX, *Compt. Rend.*, 266 (1968) 1680.
- 18 C. TAYLOR ET E. BAILEY, *Biochem. J.*, 102 (1967) 32 C.
- 19 B. HESS, K. BRAND ET H. GAY, in *Control of Energy Metabolism*, Academic Press, New York, 1965, p. 58.
- 20 I. MILMAN ET Y. YUROWITZKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 146 (1967) 301.
- 21 J. MONOD, J. WYMAN ET J. P. CHANGEUX, *J. Mol. Biol.*, 12 (1965) 88.
- 22 T. TANAKA, Y. HARANO, F. SUE ET H. MORIMURA, *J. Biochem. (Japan)*, 62 (1967) 71.
- 23 G. POGSON, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 30 (1968) 297.

Clin. Chim. Acta, 22 (1968) 165-181

BIOCHIMIE. — *Caractères cinétiques de deux formes interconvertibles de pyruvate kinase dans le globule rouge humain*. Note (*) de M. **Pierre Cartier**, M^{me} **Hélène Temkine** et M. **Jean-Paul Leroux**, présentée par M. Léon Binet.

La pyruvate kinase existe dans le globule rouge humain (normal ou déficient) sous deux formes interconvertibles, l'une (PK-B) de cinétique michaélienne insensible au fructose diphosphate, l'autre (PK-A) de cinétique allostérique, fortement activée par le fructose diphosphate

$$K(\text{FDP}) = 43 \cdot 10^{-6} \text{ M}.$$

L'analyse cinétique met en évidence l'existence de deux sites actifs dans la forme coopérative.

La pyruvate kinase est une des enzymes régulatrice de la glycolyse et de la néoglucogénèse. L'intérêt de l'étude cinétique de la pyruvate kinase du globule rouge humain (dont la déficience est associée à une anémie hémolytique) est justifié par deux constatations :

— Les constantes de Michaelis vis-à-vis du substrat, le phosphoenolpyruvate [$K_M(\text{PEP})$] varient considérablement suivant les auteurs : ces divergences ne peuvent s'expliquer que si l'enzyme présente une cinétique non michaélienne.

— Tanaka ⁽¹⁾ a récemment montré que la pyruvate kinase du globule rouge est entièrement inhibée par les anticorps anti-PK_L : la pyruvate kinase du globule rouge serait donc du type « Liver », qui obéit à une cinétique allostérique ⁽²⁾.

Nous avons cherché à préciser la cinétique de la pyruvate kinase du globule rouge humain vis-à-vis de ses substrats.

TECHNIQUES. — Les globules rouges sont hémolysés par deux congélations à -20°. L'hémoglobine est éliminée par la technique de Hennessey ⁽³⁾ et les enzymes adsorbés sur la DEAE-cellulose sont élués par une solution (KCl 0,5 M + tampon phosphate 0,003 M, pH 7,0). La pyruvate kinase est purifiée par relargage au sulfate d'ammonium entre 20 et 40 % de saturation. La solution de pyruvate kinase est dépourvue des autres activités glycolytiques (en particulier d'activités enolasique, NADH oxydasique et FDPasique, et aldolasique).

Les cinétiques ont été réalisées en enregistrant l'oxydation du NADH dans un système où le pyruvate formé est réduit en lactate par la lactico-déshydrogénase ⁽⁴⁾ (Triéthanolamine 50 mM + EDTA 5 mM, pH 7,4 ; MgCl₂ 10 mM ; KCl 50 mM ; NADH 0,25 mM ; lactico-déshydrogénase 18 unités ; PEP et ADP en concentrations variables ; dans 3 ml à 25°, 1 unité de pyruvate kinase catalyse la disparition d'une μ mole de PEP par minute).

Dans la représentation graphique de Hill $\log \frac{v}{V_{\max} - v} = f[\log(M)]$, la valeur de la constante de Michaelis apparente [$K_M(\text{app.})$] correspond à la concentration de M pour $\log \frac{v}{V_{\max} - v} = 0$.

La valeur du n de Hill, qui correspond à la pente de la droite au voisinage de la $K_M(\text{app.})$ fournit une valeur approchée (par défaut) du nombre de sites actifs ⁽⁵⁾, ⁽⁶⁾.

RÉSULTATS. — Selon les échantillons, deux types de courbes d'activité en fonction de la concentration en PEP sont obtenues :

— L'une exprime un comportement michaélien (*fig. 1*). La $K_M(\text{PEP})$ déduite de la représentation de Lineweaver-Burk est de $2,5 \cdot 10^{-5}$ M. Le FDP ne modifie pas la K_M et active très faiblement l'enzyme. Dans les deux cas, le coefficient de Hill est de $0,99 \pm 0,03$ (12 déterminations) (*fig. 2*).

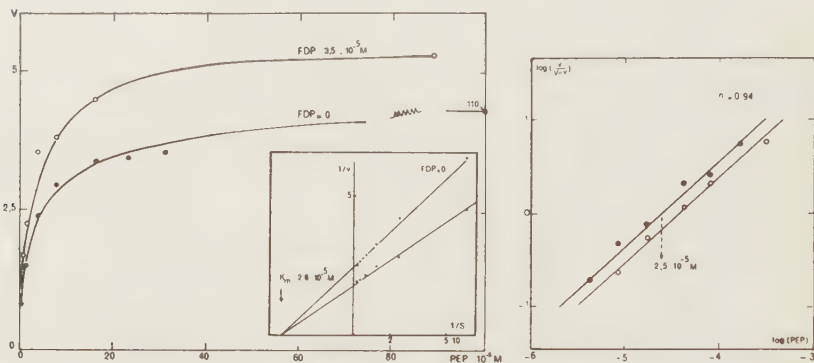


Fig. 1. — Cinétique michaélienne de la PK-B en fonction de la concentration en PEP

Fig. 2. — Représentation de Hill (PK-B) déduite de la figure 1
○ sans FDP ; ● FDP $3,5 \cdot 10^{-5}$ M

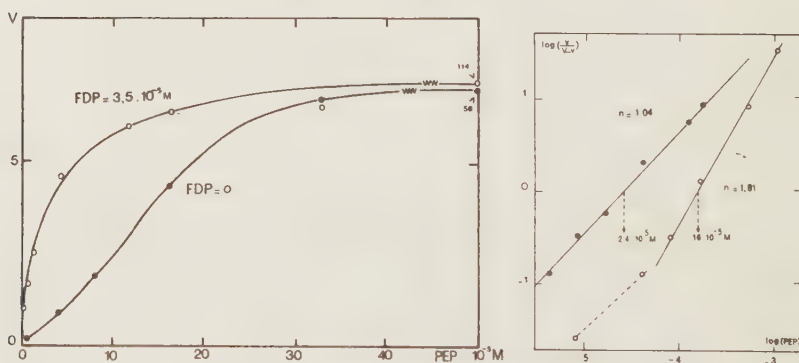


Fig. 3. — Cinétique allostérique de la PK-A en fonction de la concentration en PEP

Fig. 4. — Représentation de Hill (PK-A) déduite de la figure 3
○ sans FDP ; ● FDP $3,5 \cdot 10^{-5}$ M

— L'autre montre une cinétique coopérative en l'absence de FDP (*fig. 3*) : la $K_M(\text{app.})$, déduite de la représentation de Hill (*fig. 4*) est alors plus élevée : $19,8 \cdot 10^{-5} \pm 2,7$ (8 déterminations). Le coefficient de Hill s'élève alors à $1,81 \pm 0,03$. Sous cette forme allostérique, l'enzyme est activée à de faibles concentrations en

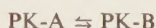
FDP $[K(\text{FDP})] = 43 \cdot 10^{-9}$ M et la sigmoïde se transforme en une hyperbole michaélienne. La $K(\text{PEP})$ en présence de FDP s'abaisse alors à la même valeur que celle de la forme non coopérative ($K_M = 2,6 \cdot 10^{-5} \pm 0,2$).

— L'ADP devient inhibiteur à des concentrations supérieures à $3 \cdot 10^{-4}$ M et l'inhibition est levée par le FDP à concentration saturante.

— L'ATP, inhibiteur, rend allostérique la forme michaélienne.

Pour ces deux formes qui ont une vitesse maximum identique, les sensibilités différentes au FDP traduisent une transformation qu'illustrent les variations du coefficient de Hill : la forme michaélienne (PK-B) insensible au FDP ($n = 0,99$) se convertit en forme allostérique (PK-A) sensible ($n = 1,81$). L'existence de deux sites actifs dans la forme coopérative est confirmée par les résultats de la représentation graphique $n \sqrt{\frac{v}{V_{\max} - v}} = f(\text{FDP})$, proposée par Blangy, Buc et Monod : seules les valeurs exprimées en racine carrée pour diverses concentrations en PEP, s'alignent sur des droites qui convergent sur l'axe des abscisses au point $-K_M(\text{FDP})$.

L'interconvertibilité des deux pyruvates kinases a été récemment signalée dans le tissu adipeux (7). Les facteurs qui provoquent la transition réversible



dans le cas du globule rouge ne sont pas encore connus : incubée à 25° (avec ou sans PEP), la forme A se transforme rapidement (120 mn) en forme B. A + 4° , la conversion inverse se produit, mais plus lentement (3 jours).

Les deux formes ont été également constatées dans deux déficits congénitaux en pyruvate kinase.

CONCLUSIONS. — La pyruvate kinase existe dans le globule rouge humain (normal ou déficient) sous deux formes, l'une michaélienne (PK-B), l'autre allostérique (PK-A).

L'interconvertibilité des deux formes fournit au globule rouge une possibilité de modulation supplémentaire très efficace de contrôle de l'activité glycolytique. Cette conversion, actuellement à l'étude, est le résultat soit d'un équilibre entre structures monomère et dimère, soit d'une transition de conformation entre deux formes dimériques.

PEP, Phosphoenolpyruvate ; FDP, Fructose-1,6-diphosphate ;
NADH, Nicotinamide adénine dinucléotide réduit.

(*) Séance du 18 mars 1968.

(1) T. TANAKA, Y. HARANO, F. SUE et H. MORIMURA, *Jal. Biochem.*, Japon, 62, 1967, p. 71.

(2) W. SUSOR et W. RUTTER, *Biochem. Biophys. res. Communic.*, 30, 1968, p. 14.

(3) M. HENNESSEY, A. WALTERSDORF et F. HUENNEKENS, *J. Clin. Invest.*, 41, 1962, p. 1257.

(4) P. CARTIER, J.-P. LEROUX et J.-C. MARCHAND, *Ann. Biol. Clin.*, 25, 1967, p. 109.

(5) D. BLANGY, H. BUC et J. MONOD, *J. Mol. Biol.*, 31, 1968, p. 13.

(6) D. ATKINSON, J. HATHAWAY et E. SMITH, *J. Biol. Chem.*, 240, 1965, p. 2682.

(7) C. POGSON, *Biochem. Biophys. Res. Communic.*, 30, 1968, p. 297.

(Enzymologie Médicale, Unité 75 INSERM,
149, rue de Sèvres, Paris, 15^e.)

